

Universidade Federal de Itajubá
Mestrado em Meio Ambiente e Recursos Hídricos

Karina da Costa Sassi Bortoloti

**QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE FONTES DE ÁGUAS
NATURAIS QUANTO AO PERFIL DE RESISTÊNCIA DE BACTÉRIAS
HETEROTRÓFICAS A ANTIMICROBIANOS, NO MUNICÍPIO DE
ITAJUBÁ (MG)**

Itajubá (MG)
2016

Karina da Costa Sassi Bortoloti

QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE FONTES DE ÁGUAS NATURAIS
QUANTO AO PERFIL DE RESISTÊNCIA DE BACTÉRIAS
HETEROTRÓFICAS A ANTIMICROBIANOS, NO MUNICÍPIO DE
ITAJUBÁ (MG)

Dissertação submetida ao programa de Pós-Graduação em
Meio Ambiente e Recursos Hídricos como parte dos
requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências
em Meio Ambiente e Recursos Hídricos.

Orientador: Prof. Dr. Rogério Melloni

Itajubá (MG)
2016

Karina da Costa Sassi Bortoloti

QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE FONTES DE ÁGUAS NATURAIS
QUANTO AO PERFIL DE RESISTÊNCIA DE BACTÉRIAS
HETEROTRÓFICAS A ANTIMICROBIANOS, NO MUNICÍPIO DE
ITAJUBÁ (MG)

Dissertação submetida ao programa de Pós-Graduação em Meio Ambiente e Recursos Hídricos como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências em Meio Ambiente e Recursos Hídricos, sob a orientação do Prof. Dr. Rogério Melloni.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Rogério Melloni
Universidade Federal de Itajubá

Profa. Dra. Andreia Maria da Anunciação Gomes
Universidade Federal de Itajubá

Profa. Dra. Marileia Chaves Andrade
Faculdade de Medicina de Itajubá

Itajubá (MG)
2016

Dedico...

Aos meus pais, Roberto e Vilma, pelos ensinamentos e valores pessoais transmitidos ao longo da vida.

Ao meu marido, Marcelo e filho, Vitor, por todo amor, apoio, incentivo e companheirismo durante esta trajetória.

Agradecimentos

Primeiramente a Deus, razão de nossa existência.

Aos meus pais, pelo incentivo aos estudos e por me ensinarem que o conhecimento é o único bem adquirido ao longo da vida, que permanecerá conosco aonde quer que a vida nos conduza.

Ao meu filho, Vitor, razão da minha vida. Agradeço sua compreensão, principalmente nos momentos mais difíceis em que precisei dedicar grande parte do meu tempo aos estudos.

Ao meu marido, Marcelo, que me apoiou, com amor, carinho, compreensão e que sempre esteve ao meu lado desde o início. Agradeço seu companheirismo.

As queridas, irmã Érika e amiga Ingrid, que sempre me incentivaram a não desistir.

A querida amiga Brenda, que sempre se dispôs a me ajudar, incondicionalmente. Agradeço a Deus pela sua amizade.

Ao orientador e professor, Rogério Melloni. Agradeço sua dedicação, amizade, apoio, paciência e compreensão.

Ao amigo, Paulo. Sua amizade, apoio e dedicação foram muito importantes para a conclusão deste trabalho.

Aos amigos João Luís e João Vítor, cuja dedicação e disponibilidade muito me ajudaram na execução da pesquisa.

A querida Elaine, que muitas vezes me recebeu em sua casa para dedicarmos aos estudos.

Aos colegas da Turma de 2013, que assim como eu, venceram muitas dificuldades para chegar até o final.

Aos membros do colegiado, em especial à Domênica, que se fez presente e se dispôs a ajudar em momentos de grande dificuldade.

Aos professores do MEMARH, pelos preciosos ensinamentos.

A Unifei, pelo modelo e exemplo de Universidade.

“Águas que movem moinhos são as mesmas águas que encharcam o chão
E sempre voltam humildes pro fundo da terra,
Terra, planeta água”

(Guilherme Arantes)

RESUMO

A resistência bacteriana a antibióticos tem gerado cada vez mais dificuldades na escolha do tratamento adequado e colocado em risco pacientes portadores de doenças infecciosas que necessitam de terapia antimicrobiana. Relatos de bactérias multirresistentes têm sido cada vez mais frequentes e não restritos a ambientes hospitalares, pois também têm sido encontradas nos ambientes solo e água. Sendo assim, há a possibilidade de adquirir infecção bacteriana com elevado grau de resistência, decorrente da ingestão de água diretamente de nascentes ou outras fontes naturais. Como o município de Itajubá possui características geográficas que favorecem a canalização das águas de nascentes próxima a áreas urbanizadas e é frequente o uso destas águas para consumo sem tratamento prévio, possibilita o risco de agravos à saúde com bactérias multirresistentes decorrentes da ingestão hídrica. Portanto, torna-se de extrema importância o monitoramento destes recursos hídricos quanto ao perfil de resistência bacteriana a antibióticos. O presente estudo teve como objetivo avaliar a qualidade hídrica de fontes potenciais para consumo no município de Itajubá (MG), por meio do perfil de resistência de bactérias heterotróficas. Para isso, foram realizados testes de susceptibilidade de bactérias heterotróficas, em amostras isoladas de onze fontes canalizadas, durante a estação chuvosa, e de nove fontes durante a estação seca, frente a dez agentes antimicrobianos (penicilina, vancomicina, aztreonam, cefalexina, amoxicilina, ceftioxima, cefepime, ciprofloxacino, cloranfenicol e gentamicina), e associados a demais características físicas, químicas e microbiológicas. Os resultados obtidos foram correlacionados por métodos estatísticos incluindo a análise de componentes principais. Os resultados demonstraram elevadas porcentagens de resistência de bactérias heterotróficas das diferentes fontes aos antimicrobianos, atingindo o pico de 61% de resistência em uma delas, durante a estação seca. Não se verificou relação entre resistência bacteriana e densidades elevadas de bactérias heterotróficas e coliformes totais, o que pode levar à falsa ideia de ausência de risco no recurso hídrico. Também não houve relação entre as estações chuvosa e seca e resistência bacteriana ao analisar individualmente a variação ocorrida em cada fonte nos períodos coletados (chuvoso e seco). Tais resultados evidenciam que a qualidade da água está alterada pela presença de bactérias multirresistentes e denotam a necessidade de novas pesquisas que possibilitem estabelecer relação entre resistência bacteriana e outras características físicas, químicas e microbiológicas.

Palavras-chave: Antibióticos. Antibiograma. Critérios de potabilidade. Resistência bacteriana.

ABSTRACT

Bacterial resistance to antibiotics has caused increasing difficulties in choosing the appropriate treatment and placed at risk patients of infectious diseases that require antimicrobial therapy. Reports of multidrug-resistant bacteria have been increasingly frequent and not restricted to hospital environments, they have also been found in soil and water environments. Thus, there is the possibility of acquiring bacterial infection with a high degree of resistance, due to the water intake directly from springs or other natural sources. As the city of Itajubá has geographical characteristics that favor the channeling of next spring water to urban areas and often the use of this water for consumption without treatment, with the risk of health problems related to multiresistant bacteria due to water ingestion. Therefore, it is extremely important to monitor these water resources as the bacterial antibiotic resistance profile. This study aimed to evaluate the water quality of potential sources for consumption in the city of Itajubá (MG), through the resistance of heterotrophic bacteria profile. For this, bacterial susceptibility tests were performed in isolated samples of eleven channeled sources during the rainy season, and nine sources during the dry season, compared to ten antimicrobial agents (penicillin, vancomycin, aztreonam, cephalexin, amoxicillin, cefoxitima, cefepime, ciprofloxacin, chloramphenicol and gentamicin), and associated with other physical, chemical and microbiological characteristics. The results were correlated by statistical methods including principal component analysis. The results showed high resistance percentages of heterotrophic bacteria from different sources antimicrobial, peaking at 61% resistance in one of them during the dry season. There was no relationship between bacterial resistance and high densities of heterotrophic bacteria and total coliforms, which can lead to the false idea of absence of risk in water resources. There was also no relationship between the rainy and dry seasons and bacterial resistance to individually analyze the variation in each source on the collected periods (wet and dry). These results show that the water quality is altered by the presence of multiresistant bacteria and denote the need for further research that enables to establish the relationship between bacterial resistance and other physical, chemical and microbiological characteristics.

Keywords: Antibiotics. Sensitivity. Potability criteria. Bacterial resistance.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Mecanismos de ação de antibióticos por meio da inibição da síntese de parede celular, inibição da síntese de proteínas, inibição da replicação de ácidos nucleicos, inibição da síntese de metabólitos essenciais e dano à membrana plasmática.....	22
Figura 2 - Mecanismos de transferência de genes de resistência bacteriana.....	27
Figura 3 - Mecanismos de resistência bacteriana aos antibióticos por meio do bloqueio da entrada, inativação por enzimas, alteração da molécula alvo e efluxo.....	28
Figura 4 - Possíveis rotas de fármacos no ambiente.....	30
Figura 5 - Novos agentes antibacterianos aprovados pela FDA no período entre 1983 a 2004.....	32
Figura 6 - Vista parcial do município de Itajubá (MG).....	43
Figura 7 - Esquema das etapas do estudo.....	44
Figura 8 - Mapeamento das onze fontes hídricas selecionadas no município de Itajubá (MG), representadas por balões amarelos.....	46
Figura 9 - Representação esquemática da determinação do número mais provável de coliformes totais e <i>Escherichia coli</i> por meio do método Colilert®.....	51
Figura 10 - Cartela Quanti-Tray positiva para coliformes totais e <i>Escherichia coli</i>	51
Figura 11 - Representação esquemática da técnica de contagem da densidade total de bactérias heterotróficas.....	52
Figura 12 - Colônias de bactérias heterotróficas em meio de cultivo PCA para a determinação da densidade de bactérias heterotróficas.....	52
Figura 13 - Representação esquemática da sequência utilizada para a seleção de colônias, fenotipagem, isolamento e antibiograma de bactérias heterotróficas.....	53
Figura 14 - Frascos contendo discos de difusão de antibiótico (A) e placa de Petri contendo os discos de difusão distribuídos sobre o ágar inoculado com bactéria heterotrófica (B).....	54
Figura 15 - Halo de inibição de crescimento de bactérias heterotróficas formado ao redor dos discos de difusão de antibióticos	55
Figura 16 - Representação gráfica da média de densidade total de bactérias heterotróficas (UFC mL ⁻¹) obtidas entre as estações chuvosa e seca. A linha tracejada representa o limite máximo de 500 (UFC mL ⁻¹) de bactérias heterotróficas estabelecido pela Portaria MS 2914/11 em águas para consumo	59

Figura 17 - Resultados das características bacteriológicas (densidade total de bactérias heterotróficas – UFC mL ⁻¹ , coliformes totais e <i>Escherichia coli</i> – NMP/100 mL) em amostragens hídricas obtidas das fontes durante a estação chuvosa.....	62
Figura 18 - Resultados das características bacteriológicas (densidade total de bactérias heterotróficas – UFC mL ⁻¹ , coliformes totais e <i>Escherichia coli</i> – NMP/100 mL) em amostragens hídricas obtidas das fontes durante a estação seca.....	63
Figura 19 - Dendrograma de similaridade construído por meio das características fenotípicas culturais das colônias selecionadas de bactérias heterotróficas isoladas de amostragens hídricas das onze fontes durante a estação chuvosa. A linha tracejada representa os agrupamentos fenotípicos formados com 80% de similaridade.....	66
Figura 20 - Dendrograma de similaridade construído por meio das características fenotípicas culturais das colônias selecionadas de bactérias heterotróficas isoladas de amostragens hídricas das nove fontes durante a estação seca. A linha tracejada representa os agrupamentos fenotípicos formados com 80% de similaridade.....	67
Figura 21 - Percentual de resistência de bactérias heterotróficas por antimicrobianos testados (Amoxicilina - AMO 10 µg, Aztreonam - ATM 30 µg, Cefalexina - CFE 30 µg, Cefepime - CPM 30 µg, Cefoxitina - CFO 30 µg, Ciprofloxacina - CIP 5 µg, Cloranfenicol - CLO 30 µg, Gentamicina - GEN 10 µg, Penicilina G - PEN 10 UI, Vancomicina - VAN 30 µg) em isolados obtidos das onze fontes durante a estação chuvosa.....	69
Figura 22 - Percentual de resistência de bactérias heterotróficas por antimicrobianos testados (Amoxicilina - AMO 10 µg, Aztreonam - ATM 30 µg, Cefalexina - CFE 30 µg, Cefepime - CPM 30 µg, Cefoxitina - CFO 30 µg, Ciprofloxacina - CIP 5 µg, Cloranfenicol - CLO 30 µg, Gentamicina - GEN 10 µg, Penicilina G - PEN 10 UI, Vancomicina - VAN 30 µg) em isolados obtidos das nove fontes durante a estação seca.....	70
Figura 23 - Porcentagem média de resistência de bactérias heterotróficas, por antimicrobiano, (Amoxicilina - AMO 10 µg, Aztreonam - ATM 30 µg, Cefalexina - CFE 30 µg, Cefepime - CPM 30 µg, Cefoxitina - CFO 30 µg, Ciprofloxacina - CIP 5 µg, Cloranfenicol - CLO 30 µg, Gentamicina - GEN 10 µg, Penicilina G - PEN 10 UI, Vancomicina - VAN 30 µg), em todas as fontes, durante as estações chuvosa e seca.....	71
Figura 24 - Percentual de resistência, sensibilidade e sensibilidade intermediária das colônias de bactérias heterotróficas isoladas em amostras obtidas das onze fontes durante a estação chuvosa, frente a antimicrobianos específicos (Amoxicilina - AMO 10 µg, Aztreonam - ATM 30 µg, Cefalexina - CFE 30 µg, Cefepime - CPM 30 µg, Cefoxitina - CFO 30 µg,	

Ciprofloxacina - CIP 5 µg, Cloranfenicol - CLO 30 µg, Gentamicina - GEN 10 µg, Penicilina G - PEN 10 UI, Vancomicina - VAN 30 µg)......72

Figura 25 - Percentual de resistência, sensibilidade e sensibilidade intermediária das colônias de bactérias heterotróficas isoladas em amostras obtidas das nove fontes, na estação seca, frente a antimicrobianos específicos (Amoxicilina - AMO 10 µg, Aztreonam - ATM 30 µg, Cefalexina - CFE 30 µg, Cefepime - CPM 30 µg, Cefoxitina - CFO 30 µg, Ciprofloxacina - CIP 5 µg, Cloranfenicol - CLO 30 µg, Gentamicina - GEN 10 µg, Penicilina G - PEN 10 UI, Vancomicina - VAN 30 µg).....73

Figura 26 - Média percentual do perfil de susceptibilidade bacteriana (resistência, sensibilidade e sensibilidade intermediária) realizado em colônias de bactérias heterotróficas isoladas em amostras hídricas obtidas das fontes durante as estações chuvosa e seca.....75

Figura 27 - Gráficos comparativos por resultados das características químicas entre as estações chuvosa e seca, sendo: a) acidez; b) alcalinidade; c) carbono orgânico total; d) oxigênio dissolvido; e) dureza e; f) pH.....80

Figura 28 - Gráficos comparativos por resultados das características físicas entre as estações chuvosa e seca, sendo: a) condutividade; b) turbidez; c) sólidos totais e; d) sólidos totais voláteis.....81

Figura 29 - Componentes principais CP1 x CP2 (a) e CP1 x CP3 (b), oriundos das médias das características físicas, químicas e microbiológicas e do percentual de resistência de bactérias heterotróficas a dez antimicrobianos das amostragens hídricas obtidas de onze fontes (▲),coletadas durante a estação chuvosa.....91

Figura 30 - Componentes principais CP1 x CP2 (a) e CP1 x CP3 (b), oriundos das médias das características físicas, químicas e microbiológicas e do percentual de resistência de bactérias heterotróficas a dez antimicrobianos das amostragens hídricas obtidas de nove fontes (▲),coletadas durante a estação seca.....93

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Exemplo de bactérias heterotróficas.....	19
Quadro 2 – Ano de descoberta e origem de alguns antibióticos.....	21
Quadro 3 – Principais classes de antimicrobianos, seus respectivos mecanismos de ação e alguns de seus representantes.....	23
Quadro 4 – Agente bacteriano patogênico de veiculação hídrica bem como sua importância para a saúde, persistência na água, resistência ao cloro, classificação infecciosa e presença em reservatório animal.....	35
Quadro 5 – Padrões microbiológicos para o controle e vigilância da água para consumo de acordo com a Portaria MS 2914/11.....	40
Quadro 6 – Padrões microbiológicos para água mineral natural e água natural envasadas e destinadas ao consumo de acordo com a RDC 275/2005.....	41
Quadro 7 – Coordenadas (latitude - sul, longitude - oeste) das fontes selecionadas.....	45
Quadro 8 – Imagens das onze fontes hídricas selecionadas e seu entorno, com suas respectivas descrições	48
Quadro 9 – Relação de antibióticos utilizados para o teste de susceptibilidade de bactérias heterotróficas, suas respectivas classes/subclasses, referências e zona de inibição (mm), para a classificação resistente (R), intermediário (I) e sensível (S)	56
Quadro 10 – Representação numérica das características morfológicas das colônias selecionadas de bactérias heterotróficas.....	58
Quadro 11 - Resultados das características microbiológicas (densidade total de bactérias heterotróficas, coliformes totais e <i>Escherichia coli</i>), incluindo o perfil de resistência bacteriana, em amostras hídricas obtidas de fontes do município de Itajubá (MG), durante as estações chuvosa e seca.....	75
Quadro 12 - Relação entre fontes com maiores porcentagens de resistência bacteriana, contaminação com <i>Escherichia coli</i> e densidade elevada de bactérias heterotróficas (> 500 UFC mL ⁻¹), durante as estações chuvosa e seca	95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Média dos números mais prováveis (NMP/100 mL) para as características microbiológicas (coliformes totais e <i>Escherichia coli</i>) obtidas nas amostragens hídricas das fontes durante as estações chuvosa e seca	61
Tabela 2 – Quantidade de colônias de bactérias heterotróficas amostradas por fonte em amostras obtidas durante as estações chuvosa e seca.....	64
Tabela 3 – Resultados da média das características físicas e químicas das amostragens hídricas obtidas das onze fontes durante a estação chuvosa	77
Tabela 4 - Resultados da média referente as características físicas e químicas das amostragens hídricas obtidas das nove fontes durante a estação seca	78
Tabela 5 – Relação entre a predominância de fontes com valores mais elevados para as características microbiológicas, físicas e químicas em amostragens hídricas entre as estações chuvosa e seca	87
Tabela 6 – Escores obtidos nos três componentes principais referentes as características físicas, químicas e microbiológicas determinadas em amostragens hídricas obtidas das onze fontes durante a estação chuvosa.....	89
Tabela 7 – Escores obtidos nos três componentes principais referentes as características físicas, químicas e microbiológicas determinadas em amostragens hídricas obtidas das nove fontes durante a estação seca.....	90

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. OBJETIVOS.....	17
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	18
3.1. Resistência bacteriana a antibióticos	18
3.2. Riscos microbiológicos do consumo de águas provenientes de fontes alternativas	33
3.3. Qualidade da água para consumo	36
3.3.1. Indicadores bacteriológicos de qualidade da água.....	36
3.3.2. Portaria 2914, de 12 de Dezembro de 2011	38
3.3.3. Resolução RDC nº 274, de 22 de Setembro de 2005	41
3.3.4. Resolução RDC nº 275, de 22 de Setembro de 2005	41
3.4. Considerações.....	42
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	43
4.1. Caracterização da área de estudo.....	43
4.1.1. Localização	43
4.2. Metodologia.....	44
4.2.1. Seleção e mapeamento das minas	45
4.2.2. Coleta das amostras.....	46
4.2.3. Análises laboratoriais	50
4.2.3.1. Análises Microbiológicas	50
4.2.3.2. Análises físicas e químicas	57
4.2.4. Análise estatística e correlação dos resultados	57
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
5.1. Resultados das características microbiológicas.....	59
5.1.1. Teste de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA).....	64
5.2. Resultados físicos e químicos.....	76
5.3. Análise estatística por meio de componentes principais	88
6. CONCLUSÕES	96
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	97
REFERÊNCIAS	
ANEXOS	

1 INTRODUÇÃO

O aumento da incidência de bactérias multirresistentes no ambiente hospitalar tem alertado as comunidades científicas em todo o mundo, uma vez que a presença de tais bactérias implica em dificuldades na seleção do antibiótico adequado, podendo, inclusive, levar a óbito pacientes com terapia antimicrobiana inadequada. Entretanto, a presença de bactérias resistentes às diversas classes de antibióticos tem sido evidenciada não somente em ambientes hospitalares, mas também no meio ambiente.

O aumento de bactérias resistentes no meio ambiente pode ser decorrente de intervenções humanas que possibilitam desequilibrar o perfil de resistência bacteriana naturalmente encontrada num determinado ambiente.

Um exemplo de degradação dos recursos hídricos encontra-se diretamente relacionada ao crescimento populacional que, associada a um sistema econômico cada vez mais complexo, reflete num aumento da extração dos recursos naturais e ocasiona impactos ecológicos gravíssimos. O uso de agrotóxicos, lançamento de efluentes químicos e excretas animais, são responsáveis por contaminar as águas com microrganismos inócuos e substâncias tóxicas. O despejo de efluentes orgânicos e a presença de antimicrobianos em águas naturais, decorrente do descarte inadequado e do seu uso indiscriminado na medicina humana e veterinária constituem causas importantes de contaminação hídrica e favorecem o predomínio de bactérias resistentes no local.

Considerando que a água é um recurso indispensável para a sobrevivência de todos os seres vivos e que se trata de um recurso com disponibilidade limitada e vulnerável, seu uso deve ser consciente e de maneira que assegure a qualidade para o consumo sem oferecer riscos à saúde. Entretanto, o racionamento da água e a poluição dos recursos hídricos têm levado a população a buscar fontes alternativas de água para consumo, como é o caso da utilização das águas naturais, em seu estado bruto, diretamente das nascentes que são captadas por meio de canalizações para locais mais próximos de serem utilizadas.

A utilização da água das nascentes, sem tratamento prévio, apesar de uma opção fácil, pode ser potencialmente prejudicial à saúde, devido a vulnerabilidade de contaminação por meio de processos naturais e antropogênicos, com perda da qualidade que pode torná-la imprópria para o consumo.

Contudo, a preocupação em oferecer fontes seguras de abastecimento de água é cada vez mais frequente e algumas variáveis tornam-se úteis para avaliar a qualidade das águas por meio de características físicas, químicas e microbiológicas, estas últimas representadas pelos coliformes totais, bactérias heterotróficas e *Escherichia coli*, cuja determinação encontra-se estabelecida pela portaria do Ministério da Saúde 2914/11, que dispõe sobre os procedimentos de controle e vigilância da qualidade da água para consumo e seu padrão de potabilidade.

No caso específico das bactérias heterotróficas, sua determinação fornece informações gerais sobre a qualidade bacteriológica da água. Os gêneros de bactérias heterotróficas, em sua grande maioria, não são considerados patogênicos, entretanto alguns podem comportar-se como patógenos oportunistas. Diante disto, a presença de bactérias heterotróficas em quantidades elevadas e com alto grau de resistência aos antimicrobianos nos recursos hídricos torna-se um fator preocupante.

Entretanto, a análise do perfil de resistência bacteriana em águas para consumo não é uma exigência da portaria supracitada, o que subestima o risco de infecção por bactérias multirresistentes nos dias atuais.

O município de Itajubá, situado no vale da Serra da Mantiqueira, possui uma topografia que favorece o aproveitamento de fontes alternativas de águas provenientes de canalizações, que captam água de nascentes e finalizam no interior de residências ou nas proximidades de regiões habitadas, facilitando o acesso da população ao consumo destas águas. Entretanto, por se tratar de um recurso altamente vulnerável, o risco de contaminação destas águas poderá ocorrer a qualquer momento e a presença de bactérias multirresistentes não deve ser descartada. Além disso, por não ser uma exigência, o teste de susceptibilidade a fim de avaliar o perfil de resistência bacteriana em águas naturais também não é executado e, por isso, pouco se conhece sobre o perfil de resistência bacteriana neste meio, o que leva a crer que o desequilíbrio ambiental imposto pelo homem, com consequente aumento da incidência de bactérias multirresistentes no ambiente, ainda não recebeu a devida consideração.

Diante disto, o presente trabalho visa estabelecer a relação entre a qualidade da água em seu estado bruto e o perfil de resistência de bactérias heterotróficas, em função de uma preocupação com o consumo das águas de nascentes em diversas fontes canalizadas utilizadas pela população do município de Itajubá durante as estações chuvosa e seca.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a qualidade microbiológica das águas provenientes de fontes naturais potenciais para consumo no município de Itajubá (MG), em seu estado bruto, quanto ao perfil de resistência de bactérias heterotróficas a agentes antimicrobianos específicos.

2.2 Objetivos específicos

- Analisar o crescimento de bactérias heterotróficas, coliformes totais e *Escherichia coli* em amostras hídricas obtidas das fontes durante as estações chuvosa e seca;
- Caracterizar fenotipicamente os isolados bacterianos e agrupá-los de acordo com suas características morfoculturais, de modo a permitir estudos quanto às variações entre as estações chuvosa e seca;
- Determinar o perfil de resistência a antimicrobianos específicos das bactérias heterotróficas isoladas de fontes hídricas;
- Determinar as características físicas (condutividade elétrica, sólidos totais, sólidos totais voláteis e turbidez), químicas (acidez, alcalinidade, carbono orgânico total, dureza, oxigênio dissolvido e pH) e microbiológicas (contagem de coliformes totais, *Escherichia coli* e densidade de bactérias heterotróficas) nas amostras hídricas obtidas durante as estações chuvosa e seca, nas principais fontes selecionadas;
- Correlacionar todas as características estudadas, nas estações chuvosa e seca, relacionando com o perfil de resistência bacteriana.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Resistência bacteriana a antibióticos

As bactérias são microrganismos que habitam nosso planeta por cerca de três bilhões e meio de anos, e grande parte de sua sobrevivência deve-se a sua enorme capacidade de adaptação (BENNETT, 2008). São microrganismos unicelulares, procariontes, envolvidos por uma parede celular constituída por um complexo carboidrato-proteína denominado de peptidoglicano. Possuem reprodução por fissão binária nas quais originam duas “células filhas” idênticas, sendo o tempo de crescimento e a divisão bacteriana bastante variável, exigindo de 20-30 minutos, no caso da *Escherichia coli*, até 24 horas para *Mycobacterium tuberculosis* (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012, p. 3-4).

Uma célula bacteriana típica é composta por: parede celular, que confere o formato da célula bacteriana e mantém a estabilidade celular em relação à pressão osmótica interna; membrana citoplasmática; citoplasma, rico em ribossomos e grânulos citoplasmáticos; região nucleóide, composta pelo material genético disperso no citoplasma; e por fim, estruturas consideradas acessórias como os flagelos, pili, esporos e cápsulas. O cromossomo bacteriano localiza-se na região nucleóide, onde se encontra o DNA, entretanto algumas células bacterianas apresentam um DNA extracromossomal denominado de plasmídeo que pode conter informações genéticas adicionais relacionadas aos fatores de virulência, toxinas e resistência a antimicrobianos e são capazes de transmitir essas informações à outras bactérias de mesma espécie ou entre espécies diferentes (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2009).

Segundo os autores supracitados, as bactérias podem ser diferenciadas por atributos como o arranjo espacial, composição da parede celular, respiração (aeróbia e anaeróbia), metabolismo (autotróficas e heterotróficas) e morfologia celular (bacilos, cocos e espirilos).

A diferenciação metabólica das bactérias as distingue em *bactérias autotróficas*, as quais extraem e utilizam o carbono proveniente do gás carbônico presente no ambiente convertendo-o em moléculas energéticas para sua utilização e *bactérias heterotróficas*, que utilizam para o seu crescimento fontes de carbono de compostos orgânicos encontrados na

natureza, provenientes de organismos vivos ou mortos e por essa razão são também chamadas de decompositoras ou saprófitas (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

As bactérias heterotróficas encontram-se amplamente difundidas na natureza podendo ser encontradas na água, solo, vegetação e ar (CETESB, 2006); além disso, são constituídas por diversos gêneros, sendo os mais frequentemente encontrados apresentados no Quadro 1.

Quadro 1 - Exemplos de bactérias heterotróficas

<i>Acinetobacter</i>	<i>Methylomonas</i>
<i>Actinomycetes</i>	<i>Micrococcus</i>
<i>Alcaligenes</i>	<i>Mycobacterium</i>
<i>Aeromonas</i>	<i>Morexella</i>
<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Nitrobacter Bastonete</i>
<i>Arthrobacter</i>	<i>Nitrosomonas</i>
<i>Bacillus</i>	<i>Nocardia</i>
<i>Beggiatoa</i>	<i>Proteus</i>
<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Pseudomonas</i>
<i>Corynebacterium</i>	<i>P. cepacia</i>
<i>Crenothrix</i>	<i>P. fluorescens</i>
<i>Desulfovibrio</i>	<i>P. maltophilia</i>
<i>Enterobacter agglomerans</i>	<i>Serratia liquefaciens</i>
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Sphaerotilus</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Sphingomonas</i>
<i>Flavobacterium</i>	<i>Staphylococcus</i>
<i>Flavobacterium meningosepticum</i>	<i>Streptococcus</i>
<i>Gallionella</i>	<i>Streptomyces</i>
<i>Hafnia alvei</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	

Fonte: Adaptado de Allen et al. (2004).

De acordo com o Ministério da Saúde, dentro deste grupo de bactérias heterotróficas, há também bactérias que habitam o intestino de humanos e animais, denominadas enterobactérias (ex. *Proteus e Escherichia coli*) (BRASIL, 2007).

Apesar de não serem considerados patogênicos, algumas bactérias heterotróficas como *Mycobacterium spp.*, *Pseudomonas spp.* e *Aeromonas spp.*, podem comportar-se como patógenos oportunistas e também causar infecções e agravos à saúde (QUIROZ, 2002), principalmente em indivíduos com o sistema imunológico comprometido como crianças e idosos (DOMINGUES et al., 2007).

O tratamento infeccioso ocorre por meio da terapia antimicrobiana, em especial o uso de antibióticos, fundamental para o tratamento de infecções causadas por bactérias e, quando eficaz, reduz consideravelmente as taxas de mortalidade, entretanto, o uso de antibióticos pode tornar-se ineficaz quando diante de bactérias resistentes, podendo levar o indivíduo a óbito em casos de insucesso no tratamento.

Os antibióticos foram inicialmente definidos como substâncias produzidas por certos microrganismos, em pequenas quantidades, com capacidade para inibir outros microrganismos (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). Segundo esses mesmos autores, o primeiro antibiótico, a penicilina, foi descoberto acidentalmente por Alexander Fleming, em 1928, ao observar a inibição do crescimento de *Staphylococcus aureus* em placas após a contaminação com um bolor, o *Penicillium notatu*. Em 1940 teve seu teste clínico aprovado e, atualmente, a penicilina engloba um grupo contendo mais de 50 antibióticos.

Em seguida, novas pesquisas culminaram com a descoberta de novos antibióticos. A ordem cronológica de descoberta de alguns antibióticos e sua origem podem ser visualizadas no Quadro 2.

Quadro 2 - Ano de descoberta e origem de alguns antibióticos

Antibióticos	Data da sua descoberta	Origem
Penicilina	1928	<i>Penicillium notatum</i>
Sulfanilamida	1935	<i>Síntese química</i>
Estreptomicina	1944	<i>Streptomyces griseus</i>
Gramicidina	1944	<i>Bacillus brevis</i>
Bacitracina	1945	<i>Bacillus licheniformis</i>
Cloranfenicol	1947	<i>Streptomyces venezuelae</i>
Polimixina	1948	<i>Bacillus polymyxin</i>
Cefalosporinas	1952	<i>Cephalosporium spp</i>
Eritromicina	1953	<i>Streptomyces erythreus</i>
Tetraciclina	1956	<i>Streptomyces spp</i>
Vancomicina	1957	<i>Streptomyces orientalis</i>
Rifampicina	1962	<i>Streptomyces mediterranei</i>
Ácido Fusídico	1962	<i>Fusidium coccineum</i>
Gentamicina	1963	<i>Micromonospora purpura</i>

Fonte: Adaptado de Sousa (2006 apud MACEDO, 2011).

A grande maioria dos antibióticos foi originada por meio de bactérias do gênero *Streptomyces* que habitam o solo. Poucas são produzidas pelas bactérias do gênero *Bacillus*, produtoras de endosporos e o restante são produzidos por bolores, principalmente o *Penicillium* e o *Cephalosporium*. Entretanto, nota-se, diferente dos demais, que a sulfanilamida foi sintetizada quimicamente, ignorando na prática a definição técnica de que antibióticos são originados exclusivamente de microrganismos (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Embora haja uma abundância de microrganismos nos ambientes naturais produzindo substâncias com ação inibitória contra outros microrganismos, é possível observar (Quadro 2) que os antibióticos, em geral, são originados de um grupo bastante limitado de microrganismos. Isso, segundo os autores acima, ocorre porque muitas das substâncias que os

microrganismos produzem são tóxicas ou correspondem a um mesmo princípio ativo já identificado.

Os antibióticos atuam inibindo o crescimento bacteriano (bacteriostático) ou causando a morte microbiana (bactericida) por meio de cinco mecanismos de ação, exemplificados na Figura 1: inibição da síntese da parede celular, inibição da síntese de proteínas, inibição da síntese de ácidos nucleicos, danos na parede celular e inibição da síntese de metabólitos (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2009). Quando atuam na síntese da parede celular (peptideoglicano) agem apenas contra células com crescimento ativo e são pouco tóxicos para as células humanas porque estas são desprovidas de peptideoglicano. Quando atuam na membrana plasmática promovem alterações na permeabilidade com consequente perda de metabólitos bacterianos. Os antibióticos que interferem na síntese de ácidos nucleicos são pouco utilizados devido a capacidade de interferir também no DNA e RNA de mamíferos em geral (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

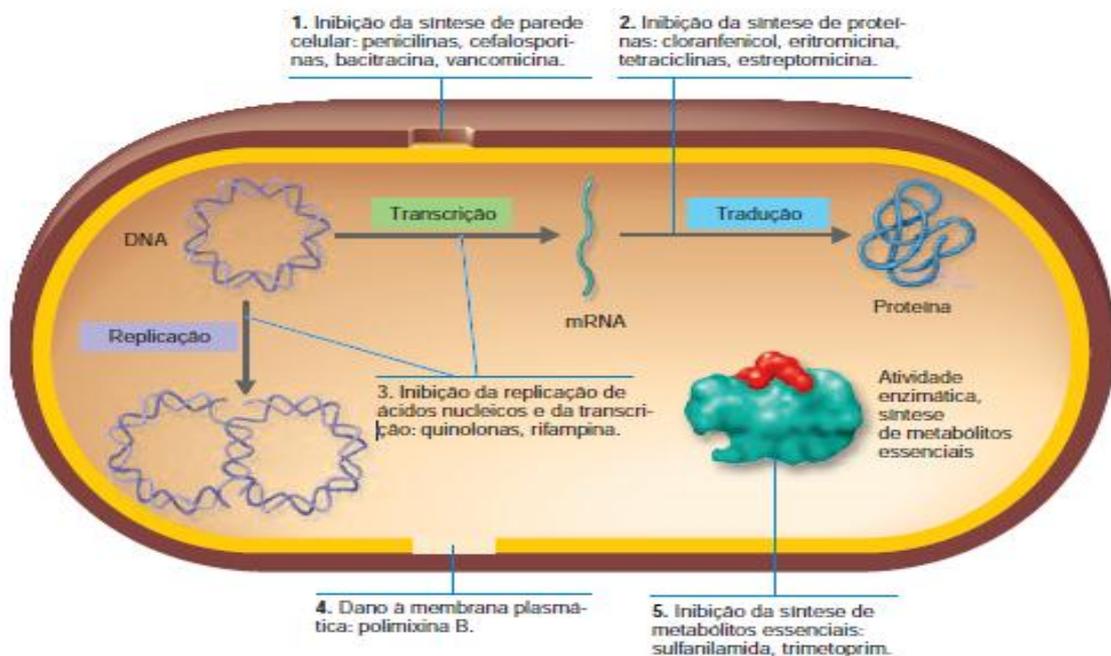


Figura 1 - Mecanismos de ação dos antibióticos por meio da inibição da síntese de parede celular, inibição da síntese de proteínas, inibição da replicação de ácidos nucleicos, inibição da síntese de metabólitos essenciais e dano à membrana plasmática.

Fonte: Tortora, Funke e Case (2012)

As principais classes de antibióticos, seus respectivos mecanismos de ação e alguns representantes estão apresentados no Quadro 3.

Quadro 3 - Principais classes de antimicrobianos, seus respectivos mecanismos de ação e alguns de seus representantes (continua)

CLASSES	SUBCLASSES		MECANISMO DE AÇÃO	REPRESENTANTES
β lactâmicos	Penicilinas	Benzilpenicilinas	Bactericidas: Interferem com a síntese da parede bacteriana	Penicilina*
				Pen. G Procáína
				Pen. Benzatina
		Aminopenicilinas		Ampicilina
		P. R. penicilinas		Amoxicilina*
		P. de amplo espectro		Oxacilina
	Cefalosporinas	1ª Geração		Carboxipenicilinas
		2ª Geração		Cefalexina*
		3ª Geração		Cefalotina
		4ª Geração		Cefoxitina*
		Carbapenens		Cefaclor
	Monobactams	Ceftriaxona		
		Cefepima*		
		Imipenem		
		Meropenem		
		Aztreonam*		
Quinolonas	Quinolonas (anos 60)		Bactericidas:	Ác. Nalidíxico
	Fluoroquinolonas (anos 80)		Inibição da DNA girase bacteriana	Ciprofloxacina*
Glicopeptídeos			Inibição de síntese proteica, de RNA m, alteração da permeabilidade MP	Vancomicina*
				Teicoplanina
Oxazolidinonas			Inibição da síntese proteica	Linezolida

Quadro 3 - Principais classes de antimicrobianos, seus respectivos mecanismos de ação e alguns de seus representantes (conclusão)

CLASSES	SUBCLASSES	MECANISMO DE AÇÃO	REPRESENTANTES
Aminoglicosídeos		Síntese de proteínas anômalas	Gentamicina* Estreptomicina Amicacina
Macrolídeos		Inibição de síntese proteica	Eritromicina Claritromicina Azitromicina
Licosaminas		Inibição de síntese proteica	Lincomicina
Nitroimidazólicos		Inativação do DNA	Metronidazol
Cloranfenicol		Inibição de síntese proteica	Cloranfenicol*
Sulfonamidas		Inibe a síntese de ácidos nucleicos (ácido fólico)	Sulfanilamida Sulfametoxazol
Tetraciclina		Inibição da síntese proteica	Tetraciclina Doxiciclina

(*) Antimicrobianos utilizados para avaliação do perfil de resistência no presente estudo.

Fonte: Adaptado de Anvisa (2007 apud CARVALHO, 2015).

O termo “antibióticos de amplo espectro” refere-se àqueles que atuam simultaneamente contra vários tipos de bactérias e por isso possibilitam o tratamento antes mesmo da identificação do microrganismo, entretanto possuem a desvantagem de agir também contra a microbiota normal do hospedeiro (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2009).

De um modo geral, para a escolha do antimicrobiano mais indicado deve-se levar em consideração aquele que apresente, simultaneamente, maior eficácia, menor efeito colateral, baixo custo e baixa capacidade de induzir, por pressão seletiva, a resistência (ANVISA, 2007a). Há ainda testes laboratoriais que possibilitam o conhecimento da

sensibilidade bacteriana e a escolha do melhor agente quimioterápico, principalmente em casos de resistência bacteriana, entretanto, nem sempre é possível aguardar os resultados.

O teste de disco-difusão, também conhecido como teste de Kirby-Bauer é o mais utilizado, devido a sua simplicidade de execução e baixo custo, porém não necessariamente o melhor, entretanto existem testes mais avançados que permitem, por exemplo, definir qual a menor concentração do antibiótico com capacidade de impedir o crescimento bacteriano (concentração inibitória mínima), denominado Teste E e outro, frequentemente automatizado, com capacidade inclusive de determinar a concentração bactericida mínima, chamado teste de diluição em meio líquido (JORGENSEN; FERRARO, 1998). Estes testes são importantes uma vez que permitem definir a concentração efetiva ideal do antibiótico, o que evita o uso impróprio e diminui o risco dos efeitos tóxicos decorrente de usos excessivos.

Infelizmente, o uso inadequado do antibiótico é prática comum. Nos Estados Unidos pelo menos 50% dos antibióticos produzidos são utilizados para ganho de peso em animais, além disso, mesmo em tratamentos adequados, a população não adere ao tratamento completamente e o abandona logo após a melhora dos sintomas (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). Estudos realizados por Baisch *et al.* (2009) corroboram os autores supracitados ao avaliarem o nível de adesão ao tratamento com antimicrobianos em 246 usuários na cidade de Rio Grande – RS, cujo resultado mostrou que 44,3% abandonaram o tratamento tão logo observaram a melhora dos sintomas. São ações como estas, dentre outras, que favorecem a sobrevivência e a proliferação de cepas bacterianas resistentes.

A resistência bacteriana a um determinado antibiótico pode ser definida, segundo Mota *et al.* (2005), como a ausência de inibição da bactéria frente a um determinado agente antibacteriano. A resistência bacteriana pode ser natural, inerente às características fenotípicas intrínsecas do microrganismo, ou adquiridas, quando uma bactéria sensível torna-se então resistente através de dois mecanismos: mutações (aleatórias ou induzidas) ou através da transferência horizontal do gene bacteriano portador da resistência para outra bactéria antes sensível, de mesma espécie ou entre espécies diferentes (FIOL; MATTOS FILHO; GROppo, 2000; ZIN; SIMM, 2007).

A resistência bacteriana originada de mutações consiste em alterações estruturais da base genética que ocorre durante o processo de replicação do DNA e quando aleatórias, ocorrem em pequena escala e permitem a evolução da espécie no ambiente, garantindo-lhes a capacidade de sobrevivência e reprodução neste meio. Quando induzidas, ocorrem por meio do contato com certos agentes químicos mutagênicos como os alquilantes, hidroxilamina e espécies reativas de oxigênio e ou radioativas (ultravioleta e ionizante), que irão ocasionar

uma cópia errônea da sequência de bases do DNA, cuja alteração poderá ser benéfica para a bactéria. Entretanto, na presença de um agente mutagênico, ocorre um desequilíbrio na velocidade de mutações, variando de 10^{-6} mutações por genes replicados espontaneamente, para até 10^{-3} mutações por genes replicados induzidos (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012, p. 228, 231; BAPTISTA, 2013).

O gene de resistência bacteriana pode ser transferido de forma horizontal ou vertical e, devido à elevada capacidade de reprodução das bactérias, em curto período, quase toda a população bacteriana torna-se resistente. Entretanto, a transferência horizontal do gene de resistência é uma característica específica da forma adquirida, uma vez que a resistência intrínseca corresponde a características fenotípicas e, portanto, somente é transferido verticalmente à prole (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

A resistência bacteriana tem origem cromossômica ou extracromossômica. A porção extracromossômica contém pequenas moléculas de DNA denominadas plasmídeos que apresentam capacidade de replicação independente do DNA cromossômico e são capazes de transportar, entre outras funções benéficas para a bactéria, os genes de resistência aos antibióticos, denominados plasmídeos R (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2009). O plasmídeo bacteriano é capaz de transportar, simultaneamente, os genes de resistência a mais de um tipo de antibiótico, ou então, uma bactéria pode conter mais de um plasmídeo, cada um carregando um gene de resistência à diferentes classes de antibióticos que podem ser transferidos à outras bactérias, estes fatores contribuem para a multirresistência bacteriana (BENNETT, 2008). Entretanto, além dos plasmídeos, o gene da resistência bacteriana também pode ser carregado por pequenos segmentos de DNA, os transposons, que devido a sua incapacidade de auto-replicação, saltam de um DNA à outro (cromossômico ou extracromossômico) (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012, p. 574).

Há quatro mecanismos envolvidos na transferência horizontal de genes de resistência (Figura 2): conjugação, transformação, transdução e transposição.

Transferência de genes de resistência

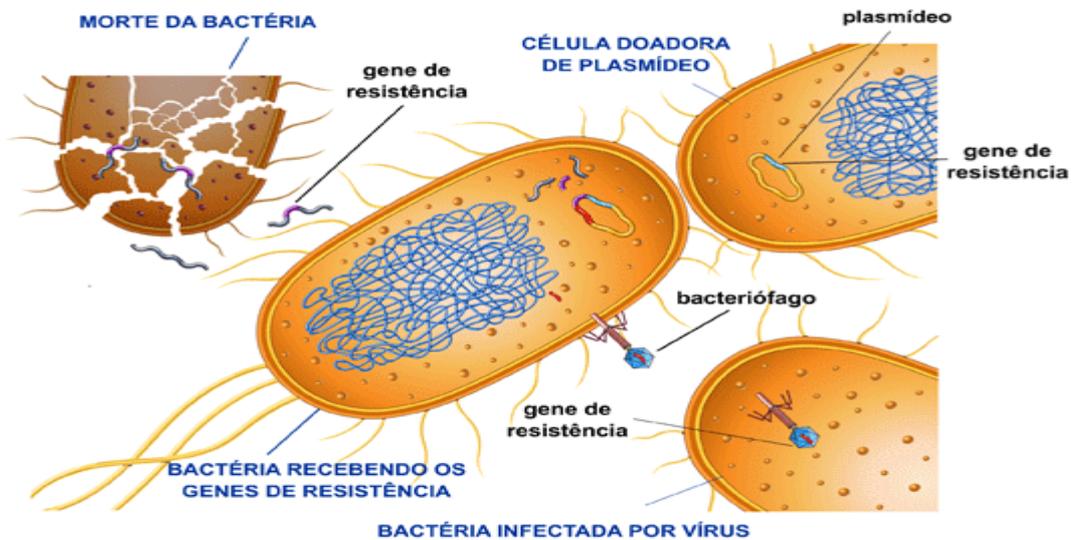


Figura 2 – Mecanismos de transferência de genes de resistência bacteriana

Fonte: Anvisa (2007b).

A conjugação ocorre por meio do pareamento bacteriano, realizado pelas fímbrias ou pilus sexual, com consequente transferência de plasmídeos, na qual a bactéria receptora do plasmídeo de resistência (plasmídeo R) passará então a adquirir as características de resistência. A transformação consiste da incorporação no genoma da bactéria receptora de frações do DNA dispersos no ambiente resultantes da morte ou lise de uma bactéria portadora e doadora do gene. A transdução ocorre na presença de um bacteriófago que atua como um vetor na qual incorpora o DNA cromossômico ou plasmidial e transfere a outra bactéria durante o processo de infecção celular. Por fim, a transposição consiste na transferência, geralmente por meio da conjugação entre bactérias, de fragmentos de DNA que poderão conter o gene de resistência, denominados transposons (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2009).

Existem quatro principais mecanismos pelos quais as bactérias manifestam a resistência ao agente antimicrobiano: destruição ou inativação enzimática do antibiótico (ex. beta lactamases); alteração da permeabilidade para bloquear a entrada do fármaco; alteração do sítio de ação do fármaco e bomba de efluxo, com consequente expulsão do fármaco para o meio extracelular (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). Os mecanismos de resistência supracitados estão exemplificados na Figura 3.

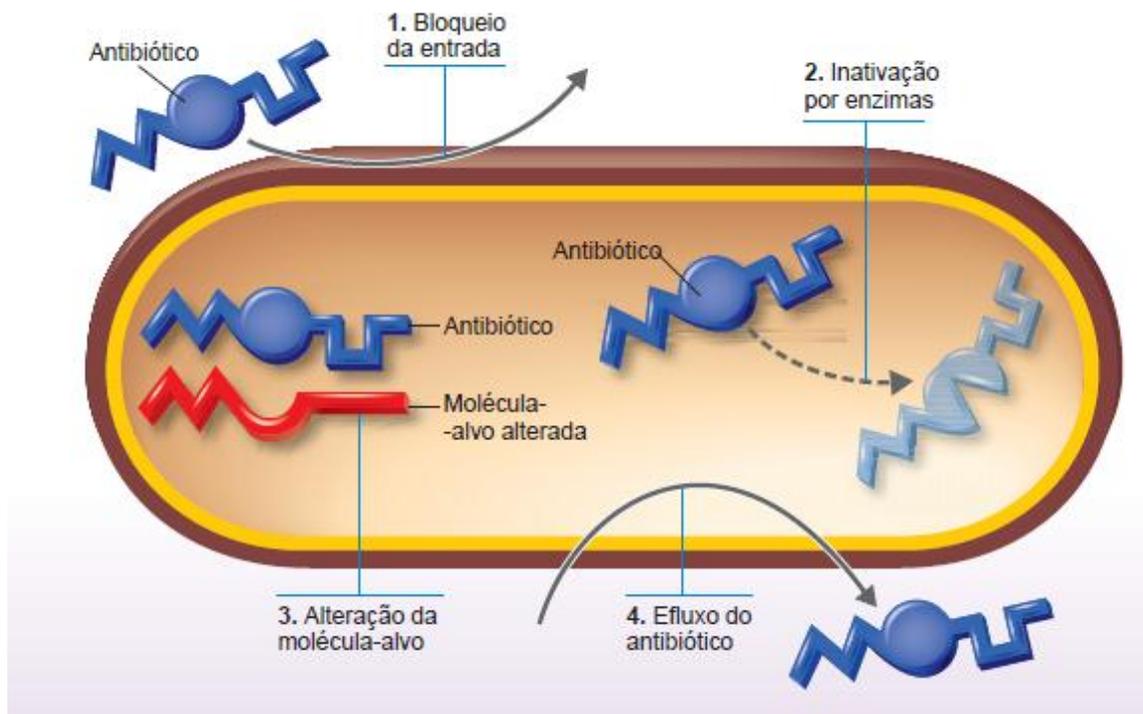


Figura 3 – Mecanismos de resistência bacteriana aos antibióticos por meio do bloqueio da entrada, inativação por enzimas, alteração da molécula-alvo e efluxo.

Fonte: Adaptado de Tórtora, Funke e Case, (2012).

Existem evidências da existência de mecanismos de resistência presente em bactérias no ambiente que ainda não foram detectados no ambiente hospitalar, como o mecanismo de inativação de alguns antibióticos que ocorre com o gênero *Streptomyces* e alerta-se para o risco de transferência a patógenos humanos (CAUMO *et al.*, 2010).

No início da antibioticoterapia, a resistência bacteriana, embora já existente, era pouco evidenciada, ou seja, havia a convivência harmônica entre bactérias resistentes e sensíveis, cada qual em seu nicho ecológico. O problema da resistência bacteriana na prática clínica surgiu a partir dos anos 50, com a descoberta e introdução de diversos antimicrobianos, e foi se agravando ao longo do tempo, onde o uso intensivo e inadequado propiciaram ambientes que permitiram a sobrevivência e a proliferação das bactérias resistentes (TAVARES, 2000). Isto porque os antibióticos, quando utilizados de maneira incorreta são capazes de alterar o perfil de resistência bacteriana em um determinado ambiente. Entretanto, não são capazes de exercer mutações nos microrganismos e por isso não induzem o aparecimento de novas características na bactéria, como a resistência bacteriana, porém, exercem “pressão seletiva”, nas quais causam a morte das cepas sensíveis

sobrevivendo as resistentes que irão multiplicar-se e então predominar (FIOL; MATTOS FILHO; GROPPPO, 2000).

Segundo a Anvisa (2007b), o contato repetitivo de bactérias à baixas concentrações de antibióticos é considerado um dos fatores mais importantes responsável pela presença de cepas bacterianas resistentes no local uma vez que, por pressão seletiva, haverá o favorecimento das cepas mais resistentes. De acordo com Jorgensen e Ferraro (1998), a presença de antibióticos no ambiente em concentrações mínimas (ng – ug / L) é suficiente para favorecer a seleção de cepas bacterianas resistentes.

A presença de antibióticos no ambiente ocorre por diversas maneiras que, de acordo com Alvarenga e Nicoletti (2010), além do descarte inadequado deste fármaco no ambiente, há ainda a possibilidade de excreção em sua forma inalterada no esgoto.

De acordo com Bila e Dezotti (2003), até 90% dos fármacos administrados na prática clínica são excretados de maneira inalterada e lançados no esgoto doméstico podendo contaminar os recursos hídricos.

Constitui um fator agravante o sistema deficitário de tratamento do esgoto no Brasil, que culmina muitas vezes com o lançamento do esgoto, ainda em sua forma “in natura”, contendo pequena quantidade de antibióticos lançados diretamente sobre as águas superficiais o que proporciona uma maior expectativa no que se refere à presença de antibióticos residuais contaminantes do ambiente aquático (MELO *et al.*, 2009).

Ainda segundo esses mesmos autores, os processos convencionais de tratamento dos esgotos não são suficientes para eliminar a contaminação dos recursos hídricos com antibióticos e seus metabólitos, haja vista que diversos fármacos, de acordo com Bila e Dezotti (2003), são capazes de resistir a tais processos e, por conseguinte, acabam por contaminar os recursos hídricos, em pequenas proporções (ug L^{-1} e ng L^{-1}), mesmo após o esgoto ter sido submetido ao tratamento prévio antes de ser lançado nos recursos hídricos, o que torna de extrema importância o monitoramento de fármacos residuais no ambiente.

As diversas vias de introdução de antimicrobianos no ambiente estão exemplificadas na Figura 4.

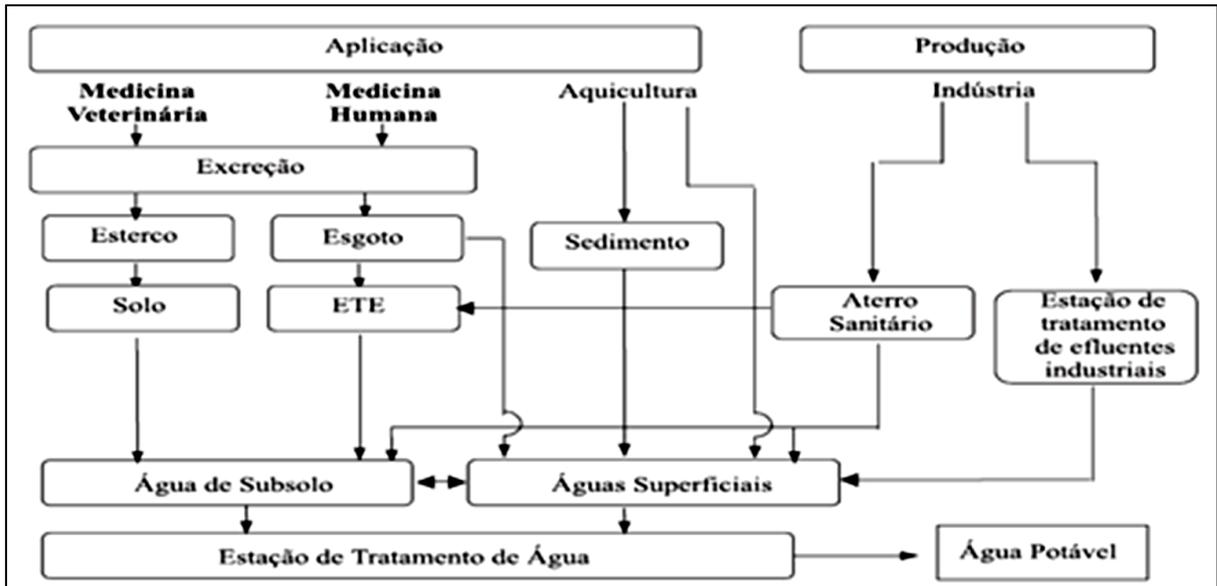


Figura 4 – Possíveis rotas de fármacos no ambiente

Fonte: Bila e Dezotti (2003).

De acordo com Alvarenga e Nicoletti (2010), a principal via de entrada de fármacos no ambiente aquático ocorre por meio da presença de resíduos em esgoto doméstico, tratados ou não, o que permite estabelecer a preocupação com a contaminação ambiental proveniente de fármacos eliminados mesmo após sua administração.

Um estudo realizado por Korb e Geller (2009), analisou a forma como eram realizadas a destinação final das eventuais sobras de antimicrobianos utilizados por usuários do Sistema Único de Saúde na cidade de Palmitos (SC), bem como do conhecimento geral que possuíam a respeito da resistência bacteriana, e resultou que dentre os usuários que interromperam o tratamento, 88,2% preferiram guardá-los em casa o que induziria um risco futuro de automedicação, enquanto que 11,8% descartaram no esgoto ou lixo doméstico. Ou seja, em ambos os casos (automedicação ou descarte inadequado) haveria o risco potencial de ocasionar a pressão seletiva. Além disso, 76% dos entrevistados não possuíam informações sobre resistência bacteriana e o restante que alegou ter algum conhecimento não foi capaz de expressar sobre o assunto.

Outro fator de origem antropogênica que favorece a evolução e disseminação da resistência bacteriana no ambiente relaciona-se com a inserção direta de bactérias resistentes por meio das excretas humanas e animais que, segundo Tavares (2000) são decorrentes da pressão seletiva imposta pela prescrição descontrolada de antimicrobianos, uso inadequado, automedicação, e utilização de antimicrobianos como fatores de crescimento animal.

Com isso torna-se frequente o predomínio de cepas multiresistentes em locais onde ocorre o uso frequente de antibióticos. Caumo *et al.* (2010) também salientam que o rápido crescimento do número de espécimes bacterianas multirresistente no ambiente deve-se, além da pressão seletiva imposta pelo uso indiscriminado de antibióticos, à capacidade que as bactérias possuem de transferir os genes de resistência a outras bactérias, o que faz do ambiente um reservatório de genes resistentes. Também argumentaram que antigamente as pesquisas sobre os mecanismos de resistência bacteriana eram conduzidas com foco em bactérias patogênicas e poucas informações foram adquiridas a respeito da origem dessa resistência e concluíram, por meio de revisões bibliográficas, que a origem da resistência está fortemente relacionada com bactérias presentes na natureza, o que permite estabelecer uma estreita relação da transmissão destes genes entre a natureza e o ambiente hospitalar. Sendo assim, os autores supracitados ressaltam a importância que se deve ter com o ambiente como passo fundamental a fim de evitar a contaminação e a disseminação de bactérias multiresistentes.

Diante disto, Korb e Geller (2009) concluíram que há uma grande necessidade de políticas sociais e educacionais que visem transmitir conhecimentos específicos sobre os riscos decorrentes do uso inadequado e descarte incorreto de antimicrobianos no ambiente e também salientou a falta de legislação para o descarte domiciliar de medicamentos.

Segundo Alvarenga e Nicoletti (2010), há realmente uma imensa lacuna na legislação brasileira quando se trata do gerenciamento de resíduos, uma vez que a Resolução de Diretoria Colegiada - RDC 306/04 que dispõem sobre o regulamento técnico para o gerenciamento de resíduos se aplica somente aos serviços de saúde, o que torna o descarte doméstico de antibióticos, efetuado pelo consumidor final, numa importante rota de contaminação ambiental, responsável pela indução da pressão seletiva e predominância de bactérias resistentes no meio hídrico.

A presença crescente de bactérias multiresistentes aos antibióticos frequentemente utilizados induziu, recentemente, ao resgate de uma classe potente de antimicrobiano (polimixina), cujo uso havia sido suspenso na década de 70 devido a sua elevada toxicidade, e que atualmente pode ser a última escolha no tratamento de bactérias Gram-negativas multiresistentes como as enterobactérias. No entanto, os primeiros casos de resistência às polimixinas já têm sido relatados em alguns países da América Latina e Ásia (CARVALHO; COGO, 2014).

A preocupação torna-se ainda maior quando estudos de Alanis (2005) mostraram que houve uma redução na inovação de pesquisas e desenvolvimento de novos fármacos antimicrobianos aprovados pelo FDA, como demonstrado na Figura 5.

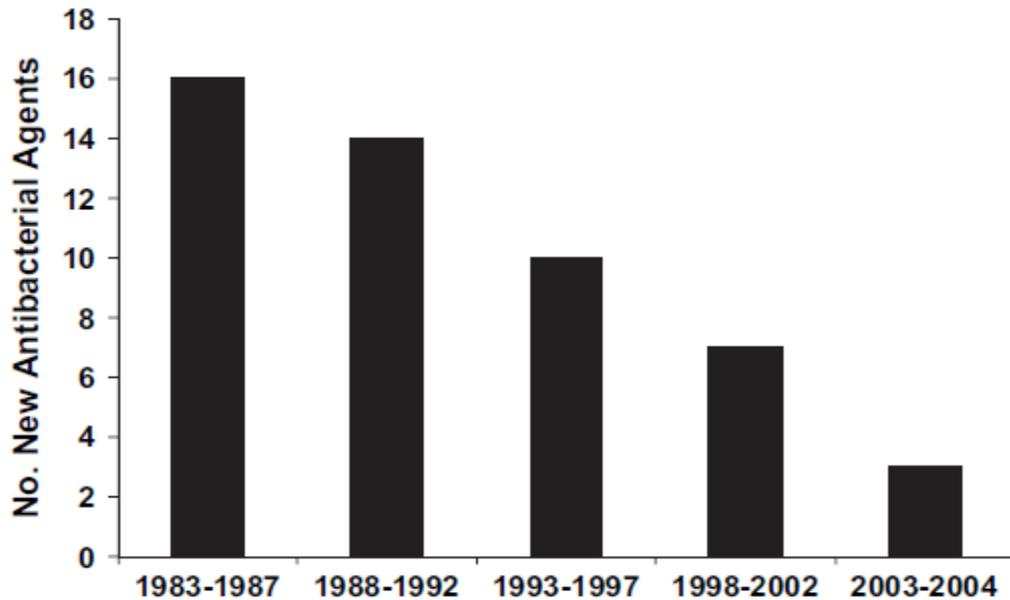


Figura 5 – Novos agentes antibacterianos aprovados pelo FDA no período entre 1983 a 2004

Fonte: Alanis (2005).

Considerando o perfil de resistência bacteriana da era pós-antibiótica, a possibilidade de óbitos decorrente de infecções comuns não deve ser descartada no século 21, devido às opções limitadas na seleção de antimicrobianos adequados (WHO, 2014). A dificuldade na seleção da terapia antimicrobiana tornou-se cada vez mais evidente e tem causado preocupações em todos os hospitais, a nível mundial, por ocasionar limitações no tratamento, falhas terapêuticas e o comprometimento na recuperação dos pacientes hospitalizados (CAUMO *et al.*, 2010).

Diante do exposto, torna-se evidente o risco da presença de bactérias potencialmente patogênicas multirresistentes não somente no ambiente hospitalar, mas também no meio ambiente. Diante disto, a ingestão hídrica de fontes potenciais para o consumo, sem tratamento prévio, pode ocasionar danos à saúde, principalmente quando ingerida por indivíduos susceptíveis e, inclusive, levar a óbito casos de dificuldade na seleção do antimicrobiano apropriado.

3.2 Riscos microbiológicos do consumo de águas provenientes de fontes alternativas

A distribuição irregular da água doce no Brasil, concentrada principalmente na bacia Amazônica, tem gerado conflitos quanto ao uso nos demais pontos do país (MESSIAS, 2008).

Segundo Lima *et al.* (2011), as alterações climáticas, a poluição e o consumo excessivo e insustentável dos recursos hídricos têm causado o racionamento cada vez mais frequente da água, levando a população a buscar fontes alternativas de abastecimento. Além disso, a população tem por hábito e questões culturais, muitas vezes equivocadas, consumir água proveniente de fontes que, segundo o manual de inspeção sanitária em abastecimento de água do Ministério da Saúde (2007), referem-se a soluções alternativas de abastecimento oriundas de mananciais subterrâneos (nascentes e minas). Estudos realizados por Mellado (2008) demonstraram que o principal motivo alegado pela população que optou pelo consumo das águas de nascentes no município de Piracicaba (SP) devia-se às características organolépticas (ausência de cloro) e, no entanto, 11 das 12 nascentes apresentaram indicativos de contaminação fecal.

Nesse sentido, Calheiros *et al.* (2004) definiram nascente como um afloramento do lençol freático (águas subterrâneas) que fornecerá uma fonte de água (superficial) que poderá então ser represada ou dispor-se em curso d'água.

As águas subterrâneas, em geral, são consideradas mais puras devido à depuração que sofrem durante sua percolação no meio, sendo, portanto, consideradas mais protegidas do que as águas superficiais (OLIVEIRA; LOUREIRO, 2000). De acordo com Martins e Kawakubo (2012), a contaminação de origem antrópica das águas subterrâneas ocorre por meio da deposição dos resíduos provenientes das atividades humanas no solo, que através da infiltração podem atingir e alterar a qualidade química e microbiológica destas águas. A poluição natural das águas subterrâneas ocorre por meio de substâncias próprias dos solos como fluoretos, ferro, manganês e arsênico (BRASIL, 2007).

Por outro lado, a contaminação microbiológica das águas de nascentes está relacionada ao livre acesso do homem e de animais na proximidade das nascentes, além das áreas de cultivo, chiqueiros, fossas e estábulos (PRZYGODDA; BONA; FALCONI, 2009).

Além disso, a falta de proteção vegetal e de barreiras no entorno das nascentes permite o acesso das enxurradas de águas da chuva que podem carrear fezes animal ou mesmo humana podendo conter bactérias multiresistentes e por fim causar a contaminação do recurso hídrico (PRZYGODDA; BONA; FALCONI, 2009). Segundo Tavares (2000), as

enterobactérias (bactérias que habitam principalmente o intestino do homem e animais) estão entre os microrganismos que mais sofreram alterações na sensibilidade aos antimicrobianos nos últimos anos.

Diante do exposto, torna-se primordial para a qualidade deste recurso hídrico que sejam adotadas estratégias comuns de preservação das nascentes que incluem: controle de erosão do solo bem como a redução de contaminantes químicos e biológico realizado por meio de barreiras vegetais; cercar a área adjacente da nascente num raio de 50 metros cuja área deverá ser considerada de preservação permanente, não se permitindo qualquer tipo de uso nesta região, a fim de evitar contaminantes químicos e biológicos através do contato direto com animais, pessoas, veículos, agrotóxicos etc; e afastar das nascentes pastos e animais a fim de evitar a contaminação das mesmas com excretas, principalmente durante períodos de chuva, seja pelo carreamento junto das enxurradas, seja pela infiltração e contaminação do lençol freático (CALHEIROS et al., 2004).

A captação das águas de nascentes geralmente ocorre por meio de canalizações a fim de conduzi-las para áreas de maior acessibilidade e aproveitamento humano. Segundo Calheiros *et al.* (2004) o uso de estruturas de captação ajuda a proteger contra contaminantes superficiais. Entretanto, a não visualização do ponto de origem da nascente, associada à relação equivocada de que água cristalina é água em boas condições para o consumo e não necessita de tratamento prévio, a torna muito mais perigosa para o consumo, visto que pouco ou nada se conhece a respeito de sua origem e condições de preservação. Além disso, muitas vezes as águas de nascentes encontram-se dentro de propriedades privadas e, portanto, desprovidas de controle sanitário oficial (MACEDO, 2011).

Em resumo, a alteração na qualidade da água a torna um produto dinâmico, proveniente de alterações do tempo e do espaço, cuja vulnerabilidade encontra-se relacionada ao uso e ocupação do solo na região da bacia hidrográfica, modificações sofridas na forma do tratamento e rede de distribuição e também às variações sazonais (BRASIL, 2007).

O consumo de água imprópria e a falta de saneamento, em conjunto, constituem a segunda maior causa de mortalidade infantil e chega a atingir 1,8 milhões de mortes de crianças por complicações de diarreia no mundo, ou seja, o equivalente a 4900 mortes por dia (PNUD, 2006).

De acordo com o texto de vigilância e controle da qualidade da água para consumo humano do Ministério da Saúde (2006), as bactérias que podem ser veiculadas pela água relacionadas com transmissão fecal-oral, bem como sua importância para o abastecimento podem ser visualizadas no Quadro 4.

Quadro 4 – Agente bacteriano patogênico de veiculação hídrica bem como sua importância para a saúde, persistência na água, resistência ao cloro, classificação infecciosa e presença em reservatório animal

Agente patogênico	Importância para a saúde	Persistência na água ^a	Resistência ao cloro ^b	Dose infecciosa relativa ^c	Reservatório animal importante
Bactérias					
<i>Campylobacter jejuni, C. coli</i>	Considerável	Moderada	Baixa	Moderada	Sim
<i>Escherichia coli</i> patogênica	Considerável	Moderada	Baixa	Alta	Sim
<i>Salmonella typhi</i>	Considerável	Moderada	Baixa	Alta ^d	Não
Outras salmonelas	Considerável	Prolongada	Baixa	Alta	Sim
<i>Shigella spp.</i>	Considerável	Breve	Baixa	Moderada	Não
<i>Vibrio cholerae</i>	Considerável	Breve	Baixa	Alta	Não
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Considerável	Prolongada	Baixa	Alta (?)	Sim
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ^e	Moderada	Podem multiplicar-se	Moderada	Alta (?)	Não
<i>Aeromonas spp.</i>	Moderada	Podem multiplicar-se	Baixa	Alta (?)	Não

(?) Não conhecido ou não confirmado.

(a) Período de detecção da fase infecciosa na água a 20°C: breve, até uma semana; moderada, de uma semana a um mês; prolongada, mais de um mês.

(b) Quando a fase infecciosa encontra-se em estado livre na água tratada com doses e tempos de contato tradicionais. Resistência moderada, o agente pode não acabar completamente destruído; resistência baixa, o agente acaba completamente destruído.

(c) A dose necessária para causar infecção em 50% dos voluntários adultos são; no caso de alguns vírus, basta uma unidade infecciosa.

(d) Segundo os resultados de experimentos com seres humanos voluntários.

(e) A principal via de infecção é o contato cutâneo, porém pacientes com câncer ou imunodepressão podem ser infectados por via oral.

Fonte: OMS (1995 apud BRASIL, 2006).

Diante disto, a utilização de fontes hídricas alternativas potenciais para o consumo, frequentemente vulneráveis à contaminação microbiológica, principalmente proveniente de origem fecal, acrescidos do risco da presença de bactérias multirresistentes, constituem fatores de riscos adicionais na perda da qualidade hídrica em seu estado bruto, sendo nestes casos fundamental a ação do poder público, no controle e vigilância da qualidade dessas águas.

3.3 Qualidade da água para consumo

A preocupação em oferecer fontes seguras de abastecimento de água é cada vez mais frequente e algumas variáveis tornam-se úteis por meio de suas particularidades, para avaliar a qualidade das águas por meio das caracterizações físico-químicas e microbiológicas.

Um dos mecanismos frequentemente adotados para o monitoramento da qualidade da água se faz por meio da detecção e quantificação de algumas bactérias consideradas indicadoras da presença de contaminação. De acordo com o manual de inspeção sanitária em abastecimento de água do Ministério da Saúde (2007), a utilização destes organismos indicadores se faz necessária, haja vista que a identificação de todos os microrganismos presentes seria impossibilitada pela complexidade, morosidade e custo elevado.

3.3.1 Indicadores bacteriológicos de qualidade da água

O uso de bioindicadores para monitorar possíveis danos ambientais decorrentes do lançamento de efluentes industriais e esgotos domésticos é de grande utilidade (DUARTE, 2011) e a escolha do indicador deverá ser capaz de mostrar a contaminação da água com material de origem fecal (humana ou animal) e, conseqüentemente, o risco potencial de contaminação por organismos patogênicos (BRASIL, 2007; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012, p. 80,781), considerando que as causas das doenças de veiculação hídrica são oriundas das fezes de indivíduos doentes (PRZYGODDA; BONA; FALCONI, 2009).

Embora não haja um único indicador capaz de atender simultaneamente todas as condições necessárias, a escolha deverá ser baseada naquele que oferecer maior indicação do risco de contaminação. Entretanto, um indicador de qualidade da água considerado “ideal” de contaminação deveria ser dotado dos seguintes requisitos, de acordo com o Manual de Inspeção Sanitária (BRASIL, 2007):

- ser de origem exclusivamente fecal;
- apresentar maior resistência que os patogênicos aos efeitos adversos do meio ambiente e processos de tratamento;
- ser removido e/ou inativado por meio do tratamento da água, pelos mesmos mecanismos e na mesma proporção que os patogênicos;
- apresentar-se em maior número que os patogênicos;
- ser de fácil identificação;
- não se reproduzir no meio ambiente.

São considerados indicadores bacteriológicos os coliformes totais, *Escherichia coli* e bactérias heterotróficas, os quais apresentam algumas vantagens e desvantagens peculiares, descritas a seguir.

- Coliformes Totais

São bactérias aeróbias ou anaeróbias facultativas, na forma de bastonetes Gram negativos e fermentadores de lactose com formação de gás, ácido e aldeído em 24-48 horas a 35°C. Embora a maioria das bactérias deste grupo não seja considerada patogênica, ainda assim podem representar riscos à saúde ao desencadear quadros de diarreia e infecções oportunistas do trato urinário (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012, p. 781).

As bactérias deste grupo, exemplificadas pelos gêneros *Escherichia*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Serratia* e *Enterobacter* (PONGELUPPE *et al.*, 2009), não são exclusivamente entéricas, podendo ser encontradas na água, solo e plantas e também apresentam a capacidade de multiplicarem-se na água, principalmente em climas tropicais, favorecendo resultados positivos em quantidades não correspondentes às condições iniciais (BRASIL, 2007; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012, p 781,).

Diante do exposto, considera-se a contagem de coliformes totais um indicador limitado na avaliação da qualidade da água bruta (*in natura*) e indicador da eficiência no processo de desinfecção/desinfestação em águas tratadas. Entretanto, os coliformes são menos resistentes a desinfecções químicas do que outros patógenos, como alguns vírus, cistos e protozoários. Sendo assim, amostras quimicamente desinfetadas que apresentarem ausência de coliformes não significa que estejam livres de contaminação, sendo, portanto, necessária à associação adicional de outros indicadores de qualidade da água (BRASIL, 2007; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012, p 781).

- *Escherichia coli*

Representa um subgrupo dos coliformes totais, também denominado coliforme fecal ou termotolerante e é considerado o indicador mais específico de contaminação fecal, devido a sua origem quase que exclusivamente entérica e, portanto, sua presença indica a grande possibilidade de haver contaminação fecal e, conseqüentemente, outros organismos entéricos patogênicos. Entretanto, diferentes dos coliformes totais, os coliformes fecais apresentam a desvantagem de possuir tempo inferior de sobrevivência no ambiente aquático, sendo útil apenas como indicador de contaminação recente (PONGELUPPE *et al.*, 2009).

- Bactérias Heterotróficas

Fornecem dados auxiliares para avaliar alterações no sistema de distribuição da água tratada, bem como a eficiência do sistema de tratamento na remoção de bactérias entretanto, quando em concentração elevada, podem inibir o crescimento de bactérias do grupo coliforme quando se utiliza o método de fermentação de lactose (CETESB, 2006).

Quando se tratam de poços, fontes e reservatórios tornam-se úteis para avaliar as condições higiênicas do local (CETESB, 2006). Entretanto, Allen *et al.* (2004) analisaram o significado da contagem de bactérias heterotróficas em água potável e concluíram que não há evidências clínicas nem epidemiológicas de que elevadas densidades de bactérias heterotróficas representem elevado risco de saúde para a população. Entretanto, mesmo assim, agências reguladoras de saúde e alguns microbiologistas, considerando a presença dentro deste grupo, de patógenos oportunistas (*Aeromonas*, *Klebsiella* e *Pseudomonas*), sugerem que haja a consideração da presença de tais bactérias como parâmetros de potabilidade não somente como monitoramento da eficiência de tratamento, mas também por razões de saúde.

Os critérios e uso dos indicadores bacteriológicos para garantir a qualidade hídrica destinada ao consumo humano são estabelecidos em algumas portarias, como detalhados a seguir.

3.3.2 Portaria 2914, de 12 de Dezembro de 2011

Essa portaria “*Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade.*”

No capítulo I, artigos 2º, 3º e 4º da portaria supracitada ficam estabelecidos que:

Art. 2º. Esta Portaria se aplica à água destinada ao consumo humano proveniente de sistema e solução alternativa de abastecimento de água.

Parágrafo único. As disposições desta Portaria não se aplicam à água mineral natural, à água natural e às águas adicionadas de sais, destinadas ao consumo humano após o envasamento, e a outras águas utilizadas como matéria-prima para elaboração de produtos, conforme Resolução (RDC) nº 274, de 22 de setembro de 2005, da Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

Art. 3º. Toda água destinada ao consumo humano, distribuída coletivamente por meio de sistema ou solução alternativa coletiva de abastecimento de água, deve ser objeto de controle e vigilância da qualidade da água.

Art. 4º. Toda água destinada ao consumo humano proveniente de solução alternativa individual de abastecimento de água, independentemente da forma de acesso da população, está sujeita à vigilância da qualidade da água.

No capítulo II, artigo 5º da portaria 2914/11 do MS fica definido que:

I - água para consumo humano: água potável destinada à ingestão, preparação e produção de alimentos e à higiene pessoal, independentemente da sua origem;

II - água potável: água que atenda ao padrão de potabilidade estabelecido nesta Portaria e que não ofereça riscos à saúde;

VI - sistema de abastecimento de água para consumo humano: instalação composta por um conjunto de obras civis, materiais e equipamentos, desde a zona de captação até as ligações prediais, destinada à produção e ao fornecimento coletivo de água potável, por meio de rede de distribuição;

VII - solução alternativa coletiva de abastecimento de água para consumo humano: modalidade de abastecimento coletivo destinada a fornecer água potável, com captação subterrânea ou superficial, com ou sem canalização e sem rede de distribuição;

VIII - solução alternativa individual de abastecimento de água para consumo humano: modalidade de abastecimento de água para consumo humano que atenda a domicílios residenciais com uma única família, incluindo seus agregados familiares;

Quanto aos padrões de potabilidade da água disposto no capítulo V da referida portaria, ficam estabelecidos os critérios para a determinação de bactérias heterotróficas conforme descrito abaixo:

Art. 28º. A determinação de bactérias heterotróficas deve ser realizada como um dos parâmetros para avaliar a integridade do sistema de distribuição (reservatório e rede).

§ 1º A contagem de bactérias heterotróficas deve ser realizada em 20% (vinte por cento) das amostras mensais para análise de coliformes totais nos sistemas de distribuição (reservatório e rede).

§ 2º Na seleção dos locais para coleta de amostras devem ser priorizadas pontas de rede e locais que alberguem grupos populacionais de risco à saúde humana.

§ 3º Alterações bruscas ou acima do usual na contagem de bactérias heterotróficas devem ser investigadas para identificação de irregularidade e providências devem ser adotadas para o restabelecimento da integridade do sistema de distribuição (reservatório e rede), recomendando-se que não se ultrapasse o limite de 500 UFC/mL.

Os padrões microbiológicos citados na referida portaria bem como a indicação de sua determinação estão apresentados no Quadro 5:

Quadro 5 – Padrões microbiológicos para o controle e vigilância da água para consumo de acordo com Portaria MS 2914/11

Microrganismo	Tipo de água	Indicador	Limite máximo aceitável
<i>Escherichia coli</i>	Água para consumo humano e água tratada	Contaminação fecal	Ausência / 100 mL
Coliformes totais	Água tratada	Eficiência de tratamento e integridade do sistema de distribuição (reservatório e rede)	Ausência / 100 mL

Fonte: Adaptado de Brasil (2011).

Em seu capítulo VI que se refere ao plano de amostragem, a portaria 2914/11 do MS descreve que:

Art. 40º. Os responsáveis pelo controle da qualidade da água de sistemas ou soluções alternativas coletivas de abastecimento de água para consumo humano, supridos por manancial superficial e subterrâneo, devem coletar amostras semestrais da água bruta, no ponto de captação, para análise de acordo com os parâmetros exigidos nas legislações específicas, com a finalidade de avaliação de risco à saúde humana.

De acordo com a Sabesp (2012), esta portaria refere-se à quinta versão que, desde a década de 70, vem passando por processos de revisões periódicas a fim de incorporar os conhecimentos adquiridos ao longo do tempo. O processo completo de revisão durou cerca de dois anos e ocorreu por intermédio do Departamento de Vigilância em Saúde Ambiental e do Trabalhador bem como da Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde, em substituição a portaria MS nº 518/2004.

O artigo realizado pela Sabesp (2012) apresentou, por meio de entrevistas, a opinião de diversos profissionais, docentes e especialistas envolvidos na área ambiental e as críticas frente a nova versão tornaram-se evidentes e esperadas, por se tratar de uma norma de abrangência nacional. Uma das críticas citadas neste artigo refere-se a não valorização da importância dos interferentes endócrinos. Além disso, ressaltou-se que a utilização dos valores de referência propostos pela Organização Mundial de Saúde deve ser analisada com cautela devido ao fato de haver realidades distintas entre os países e portanto, deveriam ser utilizados padrões que refletissem a realidade de contaminação própria do Brasil e também diferenciadas pelas características próprias de cada região.

3.3.3 Resolução RDC nº 274, de 22 de setembro de 2005

Esta resolução “*Aprova o Regulamento técnico para águas envasadas e gelo*”

Em seu anexo, refere-se às características mínimas que devem conter a Água Mineral Natural, a Água Natural, a Água Adicionada de Sais envasadas e Gelo para consumo humano. Entretanto, as características microbiológicas de água mineral natural e água natural devem seguir o que estiver estabelecido em regulamento técnico específico (BRASIL, 2005a).

A Resolução supracitada define água mineral natural e água natural, respectivamente, em seu item 2.1 e 2.2:

2.1. Água Mineral Natural: é a água obtida diretamente de fontes naturais ou por extração de águas subterrâneas. É caracterizada pelo conteúdo definido e constante de determinados sais minerais, oligoelementos e outros constituintes considerando as flutuações naturais.

2.2. Água Natural: é a água obtida diretamente de fontes naturais ou por extração de águas subterrâneas. É caracterizada pelo conteúdo definido e constante de determinados sais minerais, oligoelementos e outros constituintes, em níveis inferiores aos mínimos estabelecidos para água mineral natural. O conteúdo dos constituintes pode ter flutuações naturais.

3.3.4 Resolução RDC nº 275, de 22 de setembro de 2005

Esta resolução aprova o "*Regulamento técnico de características microbiológicas para água mineral natural e água natural*", envasadas e destinadas ao consumo.

Os padrões microbiológicos estão listados no Quadro 6.

Quadro 6 – Padrões microbiológicos para água mineral natural e água natural envasadas e destinadas ao consumo de acordo com RDC 275/2005

Microrganismo	Limite máximo aceitável
<i>Escherichia coli</i> ou coliforme fecal termotolerante	Ausência / 100 mL
Coliformes totais	2,0 UFC ou 2,2 NMP / 100 mL
<i>Enterococos</i>	2,0 UFC ou 2,2 NMP / 100 mL
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2,0 UFC ou 2,2 NMP / 100 mL
Clostrídios sulfito redutores ou <i>Clostridium perfringens</i>	2,0 UFC ou 2,2 NMP / 100 mL

Fonte: Adaptado de Brasil (2005b).

3.4 Considerações

De acordo com o manual de inspeção sanitária em abastecimento de água do Ministério da Saúde (2007), o controle laboratorial que visa atender aos critérios de potabilidade não garante a isenção dos riscos à saúde uma vez que não é possível detectar, em tempo real, as alterações bruscas que podem ocorrer na qualidade microbiológica da água bruta, tratada e distribuída. Além disso, do ponto de vista químico, não há como assegurar que a legislação dispõe da agilidade necessária para definir os limites de concentrações adotados, nem tão pouco incluir ou excluir os parâmetros necessários, uma vez que os estudos muitas vezes são baseados em análises toxicológicas e epidemiológicas com elevado grau de incerteza.

Segundo Bastos *et al.* (2000 apud BRASIL, 2007), não existem indicadores capazes de evidenciar a remoção e ou inativação da ampla variedade de patógenos passíveis de contaminação das águas. Ainda segundo esses mesmos autores, somente o tratamento da água em si, não é suficiente para garantir e manter a potabilidade da água, uma vez que pode ocorrer deterioração durante o processo de reservação, distribuição e consumo.

Diante disto, pode-se afirmar que somente o controle laboratorial como critério de potabilidade, mesmo que de modo frequente e realizado de acordo com as boas práticas em todos os processos, não é garantia de qualidade da água, pois tão importante quanto os cuidados laboratoriais estão a vigilância epidemiológica e a vulnerabilidade dos sistemas de abastecimento de água (BRASIL, 2007).

Por outro lado, a ingestão de água proveniente de fontes naturais, sem tratamento prévio, constitui uma preocupação adicional no âmbito da saúde pública devido à estreita relação existente entre o ambiente e a possibilidade de disseminação de genes de resistência. Contudo, ações para conter o desenvolvimento de resistência ainda são escassos e, com isso, elevam-se os gastos em saúde para combater microrganismos resistentes no ambiente hospitalar (WHO, 2014).

Dentro deste contexto, o presente estudo pretende contribuir para alertar sobre a importância do monitoramento ambiental como medida preventiva para a detecção de genes bacterianos multiresistentes antes da interação com o organismo humano, garantindo assim, a qualidade do recurso hídrico e a preservação da saúde populacional.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Caracterização da Área de Estudo

4.1.1 Localização

O município de Itajubá está localizado no sul do Estado de Minas Gerais por meio das coordenadas geográficas de 22° 30' 30" latitude sul e 45°27'20" de longitude oeste (PMI, 2014). Possui classificação climática de Köppen-Geiger do tipo Cwa, caracterizada por clima mesotérmico do tipo temperado úmido, com estações de verão e inverno bem definidas, inverno seco, verão quente e chuvoso com temperatura média anual no verão maior ou igual a 22°C (KÖPPEN; GEIGER, 1928).

De acordo com dados do IBGE (2010), o município possui uma população de 90.658 habitantes, distribuídos em uma área territorial de 294,835 km², o que equivale a 307,49 hab/km². Encontra-se nas encostas da Serra da Mantiqueira, o que lhe confere uma topografia do tipo ondulada-montanhosa (figura 6), sendo a maior parte do território montanhoso (78%), o restante ondulado (12%) e plano (10%). Possui, em seu conjunto geográfico, oito serras principais, além de outras menores não enumeradas e 57 bairros limitados pelos municípios de São José do Alegre, Maria da Fé, Wenceslau Brás, Piranguçu, Piranguinho e Delfim Moreira (PMI, 2014).

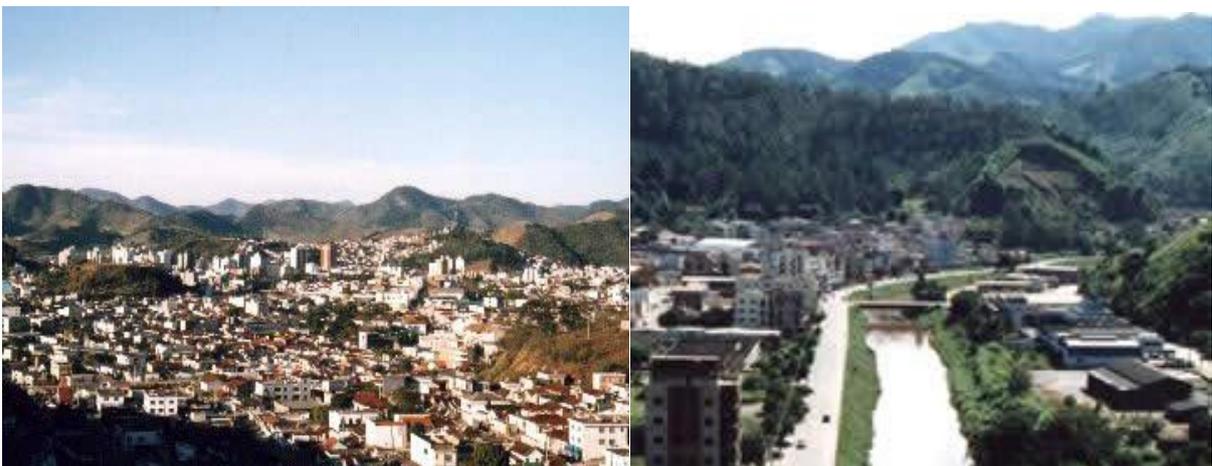


Figura 6 – Vista parcial do município de Itajubá (MG).

Fonte: Prefeitura Municipal de Itajubá (2014)

4.2 Metodologia

O presente estudo foi dividido em 4 etapas: (I) mapeamento das principais fontes potenciais de consumo no município de Itajubá; (II) coleta das amostras nas estações chuvosa e seca; (III) análises laboratoriais subdivididas em microbiológicas (densidade total de bactérias heterotróficas, número mais provável - NMP de coliformes totais e *Escherichia coli*, isolamento e caracterização fenotípica das colônias selecionadas e realização do antibiograma), físicas (condutividade elétrica, sólidos totais, sólidos totais voláteis e turbidez) e químicas (acidez, alcalinidade, carbono orgânico total, dureza, oxigênio dissolvido e pH) e; (IV) análises estatísticas e correlação dos resultados. Estas etapas podem ser visualizadas na Figura 7.

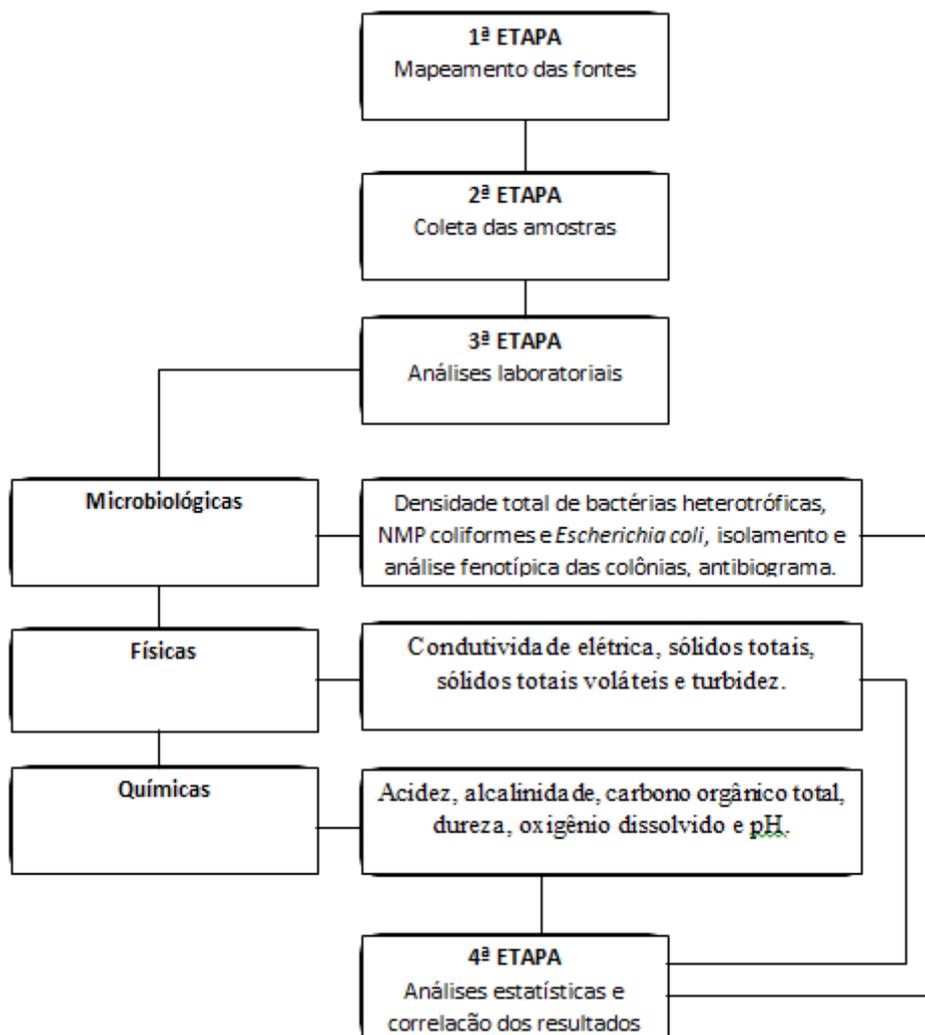


Figura 7– Esquema das etapas do estudo

4.2.1 Seleção e mapeamento das fontes

A primeira etapa do estudo consistiu na identificação das águas de fontes potenciais para consumo no município de Itajubá (MG), com posterior seleção e mapeamento. Para a identificação das fontes foram utilizados dados fornecidos pela Vigilância Epidemiológica de Itajubá, os quais foram selecionados de modo a obter áreas distintas e abrangentes do município, priorizando fontes próximas às áreas urbanizadas.

O mapeamento foi realizado a partir dos registros das coordenadas geográficas (latitude e longitude) obtidos no momento da coleta das amostras por meio do GPS (*Global Positioning System*). As coordenadas e o mapeamento das fontes hídricas selecionadas podem ser visualizados no Quadro 7 e Figura 8, respectivamente.

Quadro 7- Coordenadas (latitude – sul e longitude – oeste) das fontes selecionadas

Fontes	Latitude (S)	Longitude (O)
1	22°26'45,6"	45°25'15,7"
2	22°26'45,6"	45°25'15,7"
3	22°26'37,4"	45°25'15,4"
4	22°26'16,1"	45°25'41,0"
5	22°24'45,6"	45°26'50,3"
6	22°26'27,1"	45°25'57,7"
7	22°24'27,8"	45°27'54,7"
8	22°24'27,7"	45°27'54,8"
9	22°26'08,7"	45°26'27,6"
10	22°26'37,8"	45°25'55,6"
11	22°26'18,7"	45°28'08,55"

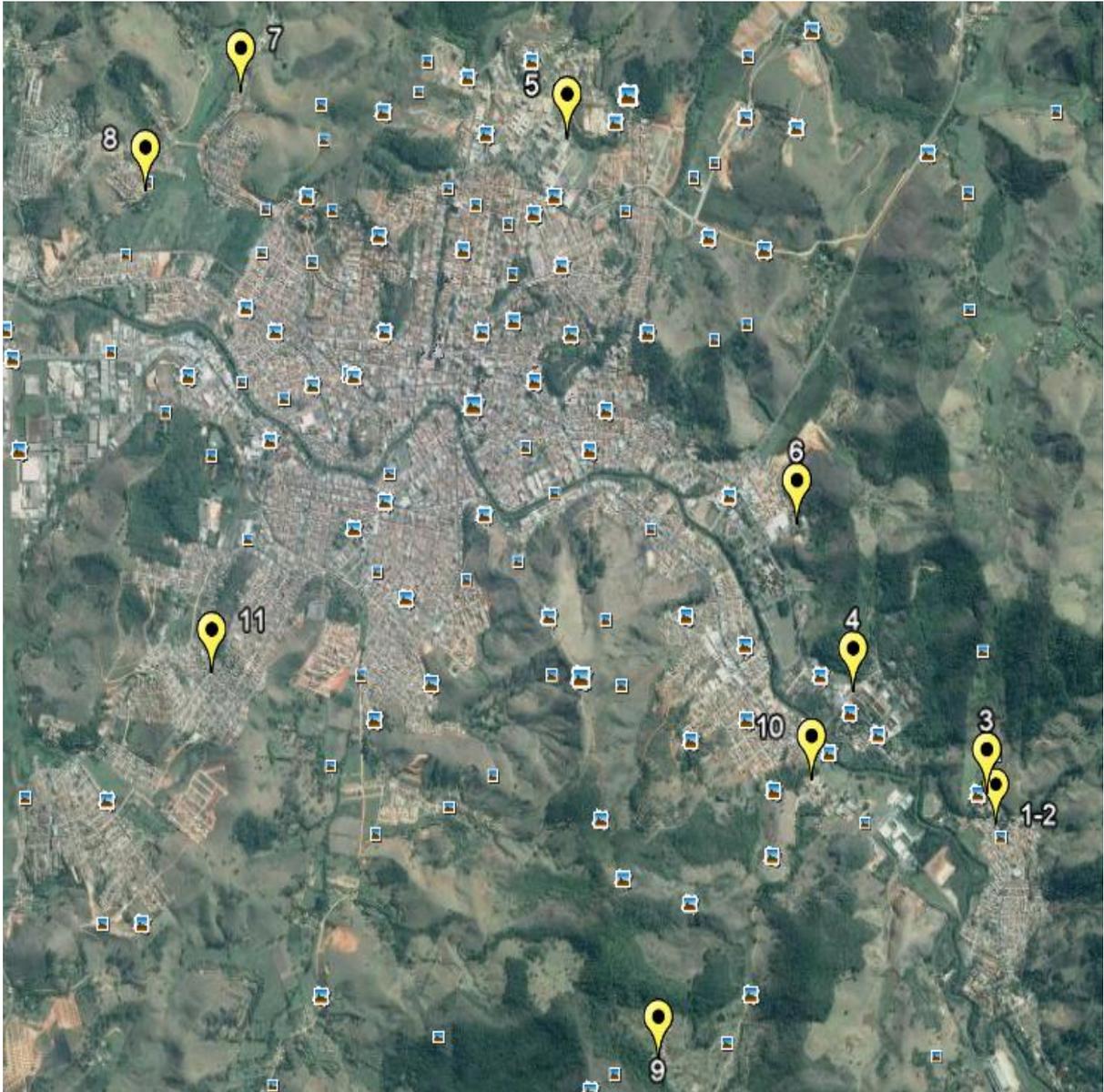


Figura 8 – Mapeamento das onze fontes hídricas selecionadas no município de Itajubá (MG), representadas por balões amarelos

4.2.2 Coleta das amostras

A segunda etapa consistiu na obtenção das amostras de água, durante estações chuvosa e seca, consecutivamente. A primeira coleta foi realizada nos meses de outubro e novembro de 2013 enquanto que a segunda coleta foi realizada no mês de setembro de 2014. De acordo com dados do Boletim Meteorológico Ciências Atmosféricas – Unifei (2014), em outubro e novembro de 2013 houve, respectivamente, precipitação de 196 e 276 mm,

enquanto que em setembro de 2014, houve precipitação de apenas 88,6 mm. Entretanto, no mês antecedente à segunda amostragem o nível de precipitação foi de apenas 16,8 mm o que impossibilitou a obtenção das amostras neste período devido ao grande número de fontes desprovidas de vazão. Diante destes dados, para fins comparativos, considerou-se a primeira e a segunda coleta como estações chuvosa e seca, respectivamente.

A amostragem hídrica, em ambas as estações, foi feita em três repetições e acondicionada em frascos estéreis com capacidade para 500 mL. No total foram obtidas 33 amostras na estação chuvosa, referente às onze fontes selecionadas e 27 amostras na estação seca, referente a nove das onze fontes selecionadas, devido a ausência de vazão nas fontes 7 e 8. As amostras foram mantidas sob-refrigeração, em caixa de isopor e gelo, até a chegada ao Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal de Itajubá. As análises foram realizadas separadamente, nas respectivas estações, e o tempo entre a coleta e o início das análises laboratoriais não ultrapassou três horas.

As imagens de cada fonte selecionada para o estudo e suas respectivas descrições estão apresentadas no Quadro 8.

Quadro 8 - Imagens das onze fontes hídricas selecionadas e seu entorno, com suas respectivas descrições (continua)

	FONTE	ENTORNO*	DESCRIÇÃO**
1			<ul style="list-style-type: none"> - Propriedade particular; - Zona urbana; - Não utilizada para consumo; - Água captada há mais de 50 anos.
2			<ul style="list-style-type: none"> - Propriedade particular; - Zona urbana; - Não utilizada para consumo; Obs. Localizada na mesma propriedade que a fonte 1.
3			<ul style="list-style-type: none"> - Comunidade de oração; - Zona urbana; - Utilizada para consumo, com tratamento prévio (filtração);*** - Água captada há mais de 30 anos.
4			<ul style="list-style-type: none"> - Rua pública; - Zona urbana; - Utilizada para consumo, sem tratamento prévio; - Captada em garrafas pets e galões d'água (5L e 20L); - Presença de animais no dia da coleta.
5			<ul style="list-style-type: none"> - Universidade; - Zona urbana; - Utilizada para consumo, sem tratamento prévio; - Captação em garrafas pets e galões d'água (5L e 20L).

Quadro 8 - Imagens das onze fontes hídricas selecionadas e seu entorno, com suas respectivas descrições (continuação)

	FONTE	ENTORNO*	DESCRIÇÃO**
6			<ul style="list-style-type: none"> - Clube recreativo; - Zona urbana; - Utilizada para consumo, sem tratamento prévio.
7			<ul style="list-style-type: none"> - Rua pública; - Zona urbana; - Utilizada para consumo, sem tratamento prévio; - Captação em garrafas pets e galões d'água (5L e 20L). - Presença de animais no dia da coleta.
8			<ul style="list-style-type: none"> - Rua pública; - Zona urbana; - Utilizada para consumo, sem tratamento prévio; - Captação em garrafas pets e galões d'água (5L e 20L); - Presença de animais no dia da coleta.
9			<ul style="list-style-type: none"> - Propriedade particular; - Zona rural; - Não utilizada para consumo;
10			<ul style="list-style-type: none"> - Propriedade particular; - Zona urbana; - Não utilizada para consumo atualmente; Obs. Já utilizada para consumo quando não havia fornecimento de água pela COPASA.

Quadro 8 - Imagens das onze fontes hídricas selecionadas e seu entorno, com suas respectivas descrições (conclusão)

	FONTE	ENTORNO*	DESCRIÇÃO**
11			<ul style="list-style-type: none"> - Propriedade particular; - Zona urbana; - Não utilizada para consumo.

(*) Características ao redor da fonte.

(**) os dados foram obtidos por meio de observações visuais e por entrevistas informais no momento da coleta.

(***) embora a água obtida da fonte seja consumida após tratamento prévio por meio de filtração, a amostra foi obtida sem tratamento a fim de analisar a qualidade da água em seu estado bruto.

4.2.3 Análises Laboratoriais

A terceira etapa, análises laboratoriais, foi subdividida em análises microbiológicas, físicas e químicas. Todas as análises laboratoriais foram realizadas no laboratório de Microbiologia e de Físico-Química da Universidade Federal de Itajubá, respectivamente. As análises estão descritas a seguir.

4.2.3.1 Análises Microbiológicas

Para as análises microbiológicas foram realizados a contagem do número mais provável (NMP) de coliformes totais e de *Escherichia coli*, a determinação da densidade total de bactérias heterotróficas, seleção, isolamento, caracterização fenotípica das colônias de bactérias heterotróficas e teste de sensibilidade a antimicrobianos.

A quantificação de coliformes totais e de *Escherichia coli* foi feita por meio do método Colilert®, aprovado pelo método padrão para análises de água e esgoto (Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater). Para a execução da técnica, dissolveu-se o reagente contendo substrato cromogênico Colilert® em 100 mL de cada amostragem de água obtida da fonte, em seguida transferiu-se para a cartela Quanti-Tray®, que foi selada e posteriormente incubada em estufa bacteriológica a $35\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$ por 24

horas. Após o período de incubação, procedeu-se a contagem dos compartimentos que alteraram a coloração de incolor para amarelo e dos compartimentos fluorescentes ao incidir luz ultravioleta em 365 nm (Figuras 9 e 10), nas quais foram convertidos em NMP de coliformes totais e *E. coli*, respectivamente, por meio da tabela de conversão apresentada pelo método, conforme modelo disposto no ANEXO 1.

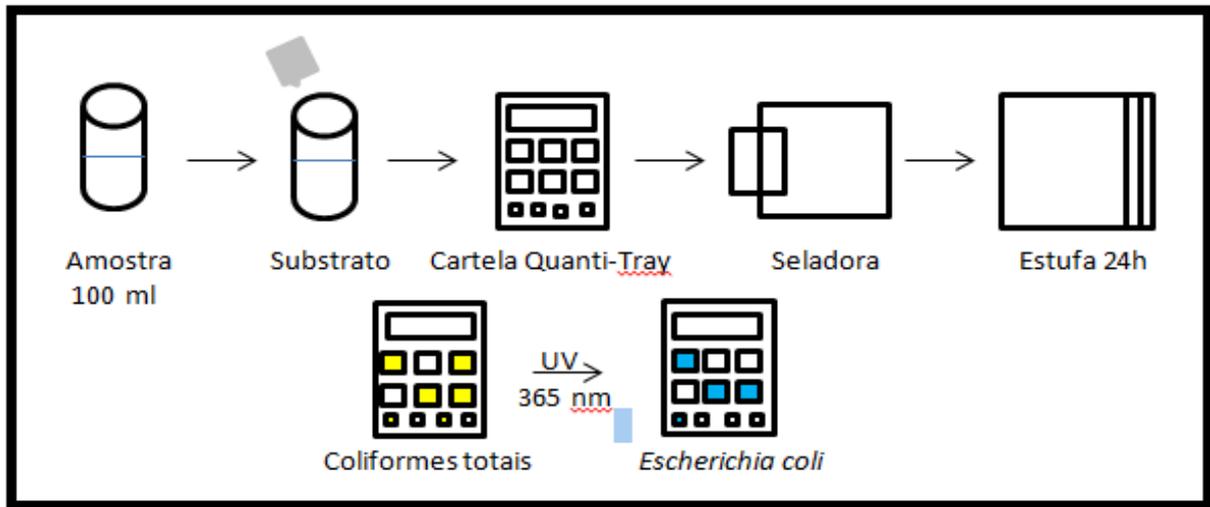


Figura 9 – Representação esquemática da determinação do número mais provável de coliformes totais e *Escherichia coli* por meio do método Colilert®



Figura 10 – Cartela Quanti-Tray positiva para coliformes totais e *Escherichia coli*

A contagem da densidade total de bactérias heterotróficas foi realizada por meio da semeadura, em câmara de fluxo laminar, de 0,1 mL de cada amostragem de água em placa de Petri contendo meio de cultura Plate Count Agar (PCA), pelo método de esgotamento ou semeadura (APHA, 1999). Na sequência, as placas foram incubadas em estufa bacteriológica a $35^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ por 48 ± 3 horas (CETESB, 2006). Após a incubação, realizou-se a contagem

total das colônias formadas e calculou-se a média aritmética da contagem obtida nas três amostras extraídas de cada ponto multiplicando o resultado obtido pelo fator de diluição a fim de obter a densidade total de bactérias heterotróficas por ml. Os procedimentos descritos para a determinação da densidade total de bactérias heterotróficas encontram-se representados na Figura 11 e as colônias de bactérias heterotróficas obtidas em meio PCA podem ser visualizadas na Figura 12.

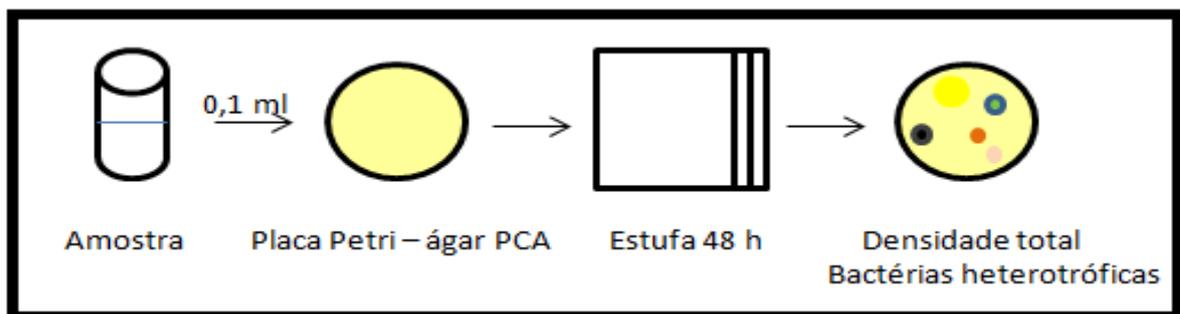


Figura 11 -Representação esquemática da técnica de contagem da densidade total de bactérias heterotróficas

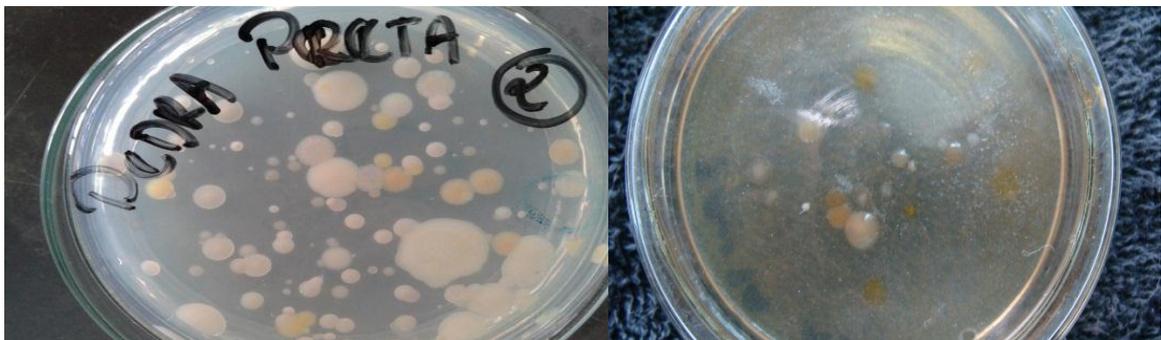


Figura 12 - Colônias de bactérias heterotróficas em meio de cultivo PCA para a determinação da densidade de bactérias heterotróficas

Para a caracterização fenotípica, destinada a possibilitar a verificação da diversidade dos isolados, selecionou-se, no máximo, quatro colônias formadas em cada placa de Petri semeada para a determinação da densidade total de bactérias heterotróficas. Devido ao fato de cada ponto possuir 3 amostras e, portanto, 3 placas semeadas, ao selecionar 4 colônias de cada placa obtiveram-se, no máximo, 12 colônias selecionadas por ponto (Figura 13). Para a seleção, procurou-se obter colônias fenotipicamente distintas e dispersas nos quatro quadrantes da placa de Petri. As colônias selecionadas foram caracterizadas quanto à forma, cor, brilho, produção ou não de goma e borda. De posse destes dados, efetuou-se o agrupamento em dendrogramas de similaridade, de forma a evidenciar os grupos selecionados com características distintas e ou semelhantes. Cada colônia selecionada foi então isolada por

meio da repicagem em tubos individuais contendo o meio de cultivo *Plate Count Agar* e submetidas novamente à incubação em estufa bacteriológica a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 48 ± 3 horas a fim de possibilitar o crescimento das mesmas (CETESB, 2006).

De posse da seleção e isolamento das cepas bacterianas, procedeu-se a realização do teste de sensibilidade a antimicrobianos, realizado por meio do antibiograma pelo método de disco-difusão de Kirby-Bauer (BAUER, 1966). Este procedimento foi executado de acordo com as normas da *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS, 2003). As sequências dos procedimentos descritos acima estão representadas na Figura 13.

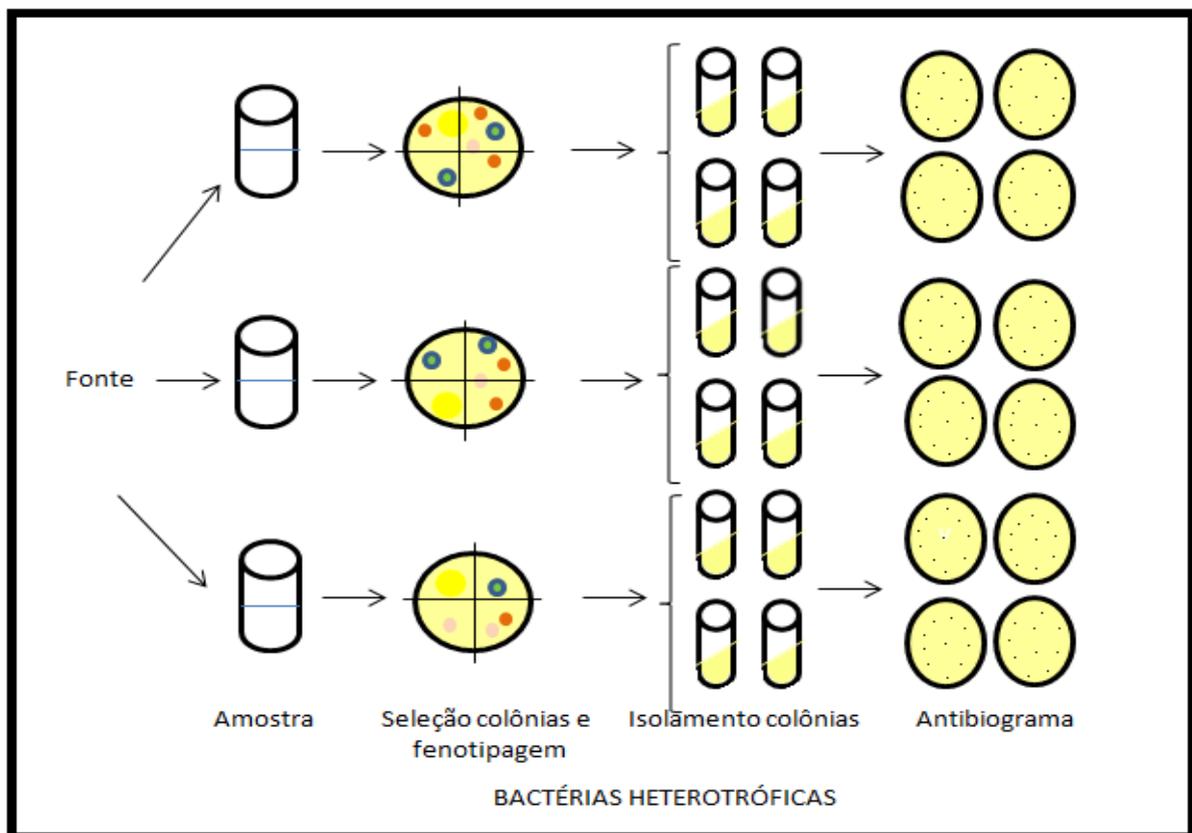


Figura 13 - Representação esquemática da sequência utilizada para seleção colônias, fenotipagem, isolamento e antibiograma de bactérias heterotróficas

Para a realização do antibiograma (Figura 14) foram selecionados 10 antibióticos, de modo a abranger as diversas classes/sub-classes de antimicrobianos: Amoxicilina 10 mcg (AMO), Gentamicina (GEN) 10 mcg, Aztreonam (ATM) 30 mcg, Cefalexina (CFE) 30 mcg, Cefepime (CPM) 30 mcg, Cefoxitina (CFO) 30 mcg, Ciprofloxacina (CIP) 5 mcg, Cloranfenicol (CLO) 30 mcg, Penicilina G (PEN) 10 U.I e Vancomicina (VAN) 30 mcg.

Todas as cepas repicadas e isoladas foram ressuspensas com o auxílio de uma alça de platina estéril em tubos contendo água estéril, até atingirem o grau de turvação 0,5 da escala de McFarland (BIER, 1994). Utilizou-se para a comparação visual, um tubo padrão contendo o grau de turvação desejado. As cepas suspensas em água estéril foram, então, inoculadas, com o auxílio de um *swab* também estéril, em placas de Petri contendo meio *Plate Count Agar* (APHA, 1999). Em seguida, foram distribuídos, com pinça estéril, os discos de difusão de cada antibiótico selecionado sobre a placa. Todos estes procedimentos foram realizados em câmara de fluxo laminar e, posteriormente, a placa foi incubada em estufa bacteriológica a $35 \pm 0,5 \text{ } ^\circ\text{C}$ por 48 ± 3 horas (CETESB, 2006).

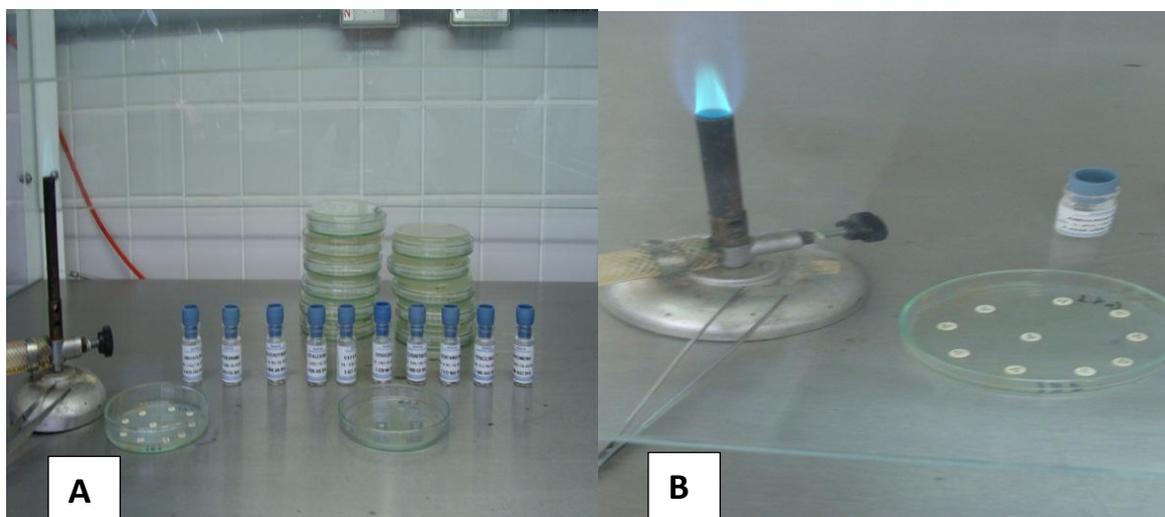


Figura 14 – Frascos contendo discos de difusão de antibiótico (A) e placa de Petri contendo os discos de difusão distribuídos sobre o ágar inoculado com bactéria heterotrófica (B)

Após a incubação, os halos de inibição formados ao redor do disco de cada antimicrobiano foram medidos, em mm, com o auxílio de um paquímetro digital, incluindo o diâmetro de 5 mm de cada disco de antibiótico (Figura 15). Os valores foram, então, comparados com os diâmetros de referência fornecidos pelo fabricante dos discos de antibióticos (CECON). Como não houve a identificação das colônias isoladas, utilizaram-se como referência, sempre que possível, grupos de espécies bacterianas dentro das quais pertencem os gêneros de bactérias heterotróficas. Os antibióticos utilizados, suas respectivas classes/subclasses, as famílias bacterianas utilizadas como referência e as respectivas zonas de inibição (mm) para permitir a definição do perfil de susceptibilidade bacteriana como Resistente (R), Intermediário (I) ou Sensível (S) foram apresentados no Quadro 9.



Figura 15 – Halo de inibição de crescimento de bactérias heterotróficas formado ao redor dos discos de difusão de antibióticos

Quadro 9 - Relação de antibióticos utilizados para o teste de susceptibilidade de bactérias heterotróficas, suas respectivas classes/subclasses, referências e zona de inibição (mm) para a classificação, resistente (R), intermediário (I) e sensível (S)

Antibiótico	Símbolo/ Conc. discos	Classe	Subclasse	Referência	Zona de Inibição em mm		
					Resistente (R)	Intermediário (I)	Sensível (S)
Amoxicilina	AMO 10 µg	Beta-lactâmico	Penicilina (aminopenicilina)	<i>Enterobacteriaceae</i>	≤ 13	14-16	≥ 17
Aztreonam	ATM 30 µg	Beta-lactâmico	Monobactam	<i>Enterobacteriaceae</i>	≤ 17	18-20	≥ 21
Cefalexina	CFE 30 µg	Beta-lactâmico	Cefalosporina 1ª G	-	≤ 14	15-17	≥ 18
Cefepime	CPM 30 µg	Beta-lactâmico	Cefalosporina 4ª G	<i>Enterobacteriaceae</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Staphylococcus spp</i> <i>Acinetobacter spp</i>	≤ 14	15-17	≥ 18
Cefoxitina	CFO 30 µg	Beta-lactâmico	Cefalosporina 2ª G	<i>Enterobacteriaceae</i>	≤ 14	15-17	≥ 18
Ciprofloxacina	CIP 5 µg	Quinolona	Fluoroquinolona	<i>Enterobacteriaceae</i> <i>Acinetobacter spp</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Staphylococcus spp</i>	≤ 15	16-20	≥ 21
Cloranfenicol	CLO 30 µg	Cloranfenicol	-	<i>Enterobacteriaceae</i> <i>Staphylococcus spp</i>	≤ 12	13-17	≥ 18
Gentamicina	GEN 10 µg	Aminoglicosídeo	-	<i>Enterobacteriaceae</i> <i>Acinetobacter spp</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Staphylococcus spp</i>	≤ 12	13-14	≥ 15
Penicilina G	PEN 10 UI	Beta-lactâmico	Penicilina (benzilpenicilina)	<i>Enterococcus spp</i>	≤ 14	-	≥ 15
Vancomicina	VAN 30 µg	Glicopeptídeos	-	<i>Enterococcus spp</i>	≤ 14	15-16	≥ 17

Fonte: Adaptado de Centro de Controle e Produtos para Diagnóstico LTDA –CECON (2012)

4.2.3.2 Análises físicas e químicas

As análises físicas e químicas foram realizadas no Laboratório de Físico-química da Universidade Federal de Itajubá somente após os testes microbiológicos iniciais, a fim de não haver a contaminação do material coletado. As características físicas e químicas analisadas foram: turbidez, sólidos totais e sólidos totais dissolvidos, potencial hidrogeniônico - pH, acidez, alcalinidade, oxigênio dissolvido, carbono orgânico, dureza e condutividade elétrica. Todas estas características possuem peculiaridades individuais que contribuem para avaliar a qualidade da água.

Para as medições de pH, condutividade e oxigênio dissolvido foi utilizado uma sonda de múltiplos parâmetros da marca Inolab. A turbidez foi analisada por meio da técnica de nefelometria por um turbidímetro da mesma marca. Para a quantificação da acidez, alcalinidade e dureza utilizou-se o método volumétrico de neutralização através da titulação com solução padrão de hidróxido de sódio (NaOH), ácido clorídrico (HCL) e ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), respectivamente. Para a determinação de sólidos totais e sólidos totais voláteis foi utilizada a técnica de evaporação em estufa e mufla com posterior pesagem em balança analítica, enquanto que a dosagem de carbono orgânico foi realizada no equipamento analisador de carbono orgânico total (COT) da marca Analytikjena.

As características pH, turbidez, dureza e sólidos totais são requeridas pela Portaria 2914/11 do MS de potabilidade, as demais foram utilizadas como dados complementares segundo as particularidades de cada uma.

4.2.4 Análise estatística e correlação dos resultados

A 4ª etapa da metodologia refere-se à análise estatística e correlação dos resultados.

Utilizou-se o *software* STATISTICA para estabelecer a variação e ou similaridade das colônias de bactérias heterotróficas selecionadas quanto às características fenotípicas, nas duas estações. Para possibilitar a análise, os dados fenotípicos qualitativos foram convertidos em dados numéricos conforme descritos no Quadro 10.

Quadro 10 – Representação numérica das características morfológicas das colônias selecionadas de bactérias heterotróficas

COR	FORMA	BORDA	BRILHO	GOMA
Amarela (1)	Circular (1)	Filamentosa (1)	Ausência (1)	Ausência (1)
Branca (2)	Filamentosa (2)	Lisa (2)	Presença (2)	Presença (2)
Caramelo (3)	Irregular (3)	Rugosa (3)		
Creme (4)	Puntiforme (4)			
Laranja (5)				
Marrom (6)				
Marrom claro (7)				
Marrom e bege (8)				
Preta (9)				
Rosa (10)				
Transparente (11)				
Transparente com halo verde (12)				

De posse de todos os dados físicos, químicos, microbiológicos e de resistência, realizou-se a análise multivariada por meio da técnica de componentes principais, pelo *software* PC-ORD[®]. Este método permite correlacionar todas as características analisadas simultaneamente e, com isso, estabelecer a relação existente entre as variáveis analisadas e a qualidade do recurso hídrico (Mc CUNNE; MEFFORD, 1997).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Resultados das características microbiológicas

As bactérias heterotróficas estão amplamente difundidas na natureza e, por isso, são também chamadas de “bactérias ambientais”. A sua determinação está inserida na Portaria do MS 2914/11 e, são aceitáveis até o limite de 500 UFC mL^{-1} de água para consumo humano. Com base nesse critério, as amostras obtidas das fontes foram submetidas à determinação da densidade total de bactérias heterotróficas e os resultados obtidos nas onze fontes da estação chuvosa e nas nove fontes da estação seca foram apresentados na Figura 16.

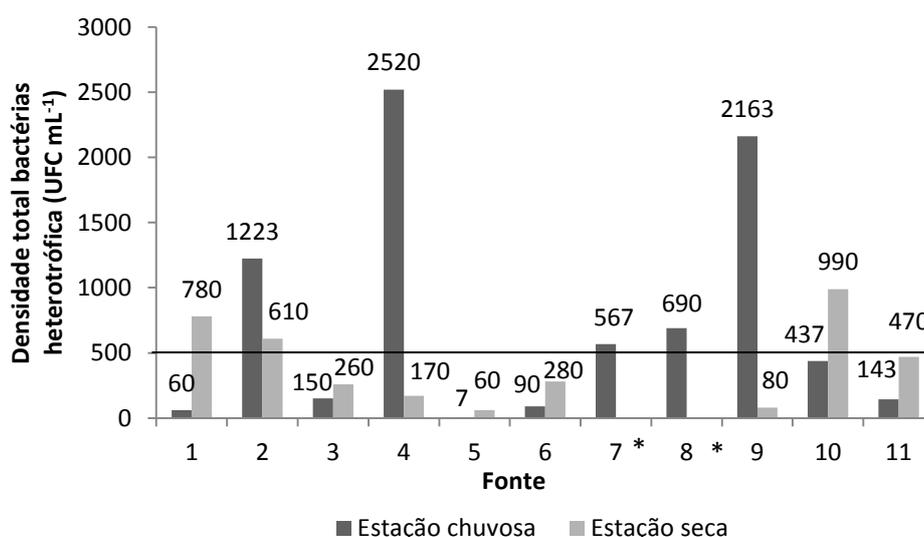


Figura 16 - Representação gráfica da média de densidade total de bactérias heterotróficas (UFC mL^{-1}) obtida entre as estações chuvosa e seca. A linha representa o limite máximo de $500 \text{ (UFC mL}^{-1})$ de bactérias heterotróficas estabelecido pela Portaria MS 2914/11 em águas para consumo.

(*) As amostragens hídricas das fontes 7 e 8 durante a estação seca não foram coletadas devido à ausência de vazão.

Ao analisar isoladamente os resultados obtidos, observa-se que a densidade total de bactérias heterotróficas ultrapassou o limite máximo permitido em cinco das onze fontes (2, 4, 7, 8 e 9) na estação chuvosa, enquanto que na estação seca ultrapassou o limite máximo permitido em três das nove fontes (1, 2 e 10), o que correspondem a 45%

e 33% das fontes contendo densidades de bactérias heterotróficas acima do limite permitido para potabilidade durante as estações chuvosa e seca, respectivamente.

Entre as onze fontes, quatro delas (3, 5, 6 e 11) apresentaram, em ambas as estações, quantidade de bactérias heterotróficas dentro dos limites estabelecidos pela portaria vigente, o que representa somente 36% das fontes em conformidade com o critério de potabilidade para este atributo. As demais fontes (1, 2, 4, 7, 8, 9 e 10), apresentaram, em pelo menos um período chuvoso ou seco, contagens de bactérias heterotróficas insatisfatórias para consumo, correspondendo a 64% das fontes.

Os maiores valores encontrados para densidade total de bactérias heterotróficas foram para as águas das fontes 4 e 9 durante a estação chuvosa, com 2520,0 UFC mL⁻¹ e 2163 UFC mL⁻¹, respectivamente. Em contraste, a fonte 5, correspondente às estações chuvosa e seca, foi a que apresentou a menor contagem de bactérias heterotróficas, 7 UFC mL⁻¹ e 60 UFCmL⁻¹, respectivamente.

A contagem de bactérias heterotróficas foi mais elevada, porém não necessariamente acima do limite estabelecido pela portaria, para a maioria das fontes, durante a estação seca (1, 3, 5, 6, 10 e 11), embora picos mais altos tenham ocorrido em algumas fontes (2, 4 e 9) durante a estação chuvosa. Segundo Rocha (2007), a estação chuvosa possui fatores favoráveis e desfavoráveis para a determinação da presença bacteriana no recurso hídrico. Tanto a lixiviação como temperaturas elevadas (característicos da estação chuvosa) são fatores que favorecem o aumento da densidade de bactérias heterotróficas, por outro lado, nesta mesma estação também pode haver diminuição da densidade de bactérias devido ao efeito de diluição em decorrência do aumento do volume hídrico. Em contrapartida, a estação seca promove redução do volume dos recursos hídricos que poderá ocasionar concentração das bactérias na água. São diversos os fatores que influenciam as densidades de bactérias nos recursos hídricos, e, por essa razão, não se pode dizer qual exerce maior influência na densidade bacteriana. Entretanto, Gasparotto (2011) analisou a densidade de bactérias heterotróficas em águas de nascentes no município de Piracicaba/SP durante todos os meses do ano e concluiu que não houve associação entre as densidades de bactérias heterotróficas e o índice pluviométrico devido à ausência de um padrão nas contagens elevadas deste atributo durante os meses.

Considerando que as águas naturais provenientes de fontes potenciais de consumo geralmente são ingeridas sem tratamento prévio e que 64% das fontes

apresentaram contagens elevadas de bactérias heterotróficas em pelo menos uma estação, são necessários estudos complementares, principalmente em grupos populacionais susceptíveis que consomem águas naturais, sem tratamento prévio, a fim de estabelecer se há correlação entre o consumo destas águas contendo elevadas concentrações de bactérias heterotróficas e o perfil epidemiológico relacionado com agravos à saúde decorrentes da ingestão hídrica.

O risco de infecção microbiológica por meio da ingestão destas águas torna-se ainda mais preocupante quando se analisam os resultados apresentados nas demais características bacteriológicas exigidas pela Portaria MS 2914/11 (coliformes totais e *Escherichia coli*).

Com base nestas características, as amostras obtidas das fontes foram submetidas à contagem do número mais provável de coliformes totais e *Escherichia coli* e os resultados obtidos nas onze fontes durante a estação chuvosa e nas nove fontes durante a estação seca estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Média dos números mais prováveis (NMP/100 mL) para as características microbiológicas (coliformes totais e *Escherichia coli*) obtidas nas amostragens hídricas das fontes durante as estações chuvosa e seca

Estações	Atributo microbiológico (NMP/100 mL)	Fonte										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Chuvosa	Coliformes totais	94,2	1985,4	663,8	266,6	13,0	472,5	2274,9	1031,1	2419,2	2419,2	884,5
	<i>Escherichia coli</i>	6,4	21,8	8,7	0,0	0,0	0,7	20,8	5,1	1,4	84,2	22,3
Seca	Coliformes totais	2419,2	>2419,2	1913,6	100,5	131,3	172,2	*	*	187,2	2419,2	344,8
	<i>Escherichia coli</i>	200,5	200,5	30,6	0,0	28,8	0,0	*	*	1,0	27,1	144,5

(*) amostra não obtida nos pontos 7 e 8 devido ausência de vazão. Em negrito: resultados em desacordo com o padrão de potabilidade exigido pela Portaria 2914/11 que preconiza ausência total para coliformes totais e *Escherichia coli* em 100 mL de amostra.

Em relação aos coliformes totais, 100% das fontes apresentaram crescimento positivo em ambas as estações, sendo que os maiores valores da estação chuvosa ocorreram simultaneamente nas fontes 9 e 10, seguidos pelos fontes 7 e 2, respectivamente, enquanto que na estação seca, os maiores valores obtidos ocorreram na fonte 2, seguido simultaneamente pelas fontes 1 e 10. Entretanto, a presença de coliformes totais na água em estado bruto não necessariamente implica em contaminação, uma vez que as bactérias deste grupo encontram-se amplamente difundidas na natureza (BRASIL, 2007). Entretanto, a Portaria 2914/11 do MS determina ausência de coliformes

totais em 100 mL de amostra em águas destinadas ao consumo e, por essa razão, nenhuma destas fontes poderia ser considerada própria para tal finalidade.

Em relação ao indicador de contaminação fecal, aproximadamente 80% das fontes apresentaram crescimento de *Escherichia coli* nas amostras de água, indicativo de contaminação recente, uma vez que tais bactérias sobrevivem pouco tempo no ambiente, enquanto que somente as fontes 4 e 5 durante a estação chuvosa, 4 e 6 durante a estação seca apresentaram ausência total. Outros estudos também apresentaram incidências para a presença de coliformes totais e *Escherichia coli* em águas obtidas de fontes naturais, como o realizado por Przygodda, Bona e Falconi (2009), em análise de 515 amostras de águas *in natura* em municípios do Estado do Paraná, obtendo 78,64% delas com coliformes totais e 40,5% com *Escherichia coli*.

Entretanto, exclusivamente pelo critério bacteriológico de potabilidade da água (Portaria 2914/11), os dados do presente trabalho devem ser analisados em conjunto e, sendo assim, nenhuma fonte pode ser considerada aceitável para consumo em seu estado bruto. As Figuras 17 e 18 permitem visualizar os resultados das características microbiológicas do presente estudo (densidade total de bactérias heterotróficas em UFC mL⁻¹, número mais provável de coliformes totais e *Escherichia coli* em 100 mL) obtidos durante as estações chuvosa e seca, respectivamente.

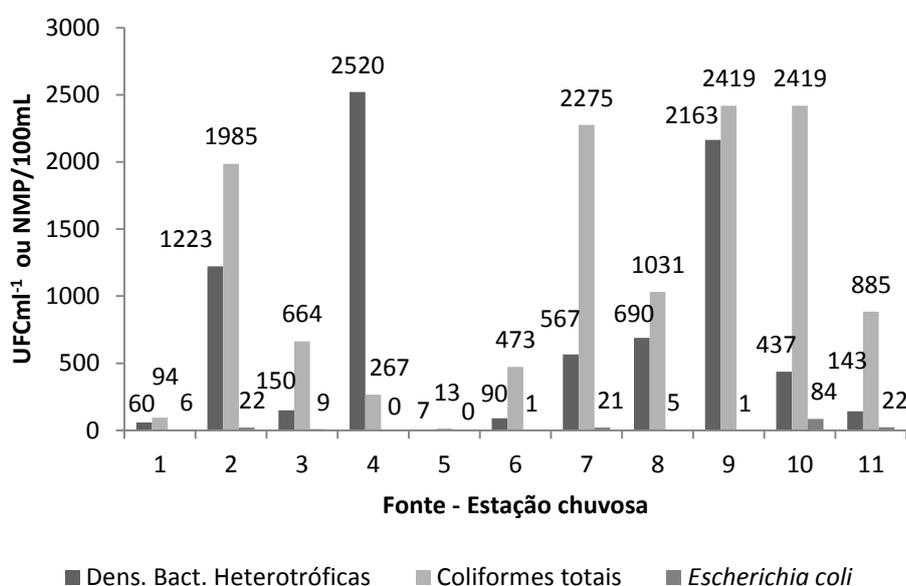


Figura 17 – Resultados das características bacteriológicas (densidade total de bactérias heterotróficas – UFC mL⁻¹, coliformes totais e *Escherichia coli* – NMP/100 mL) em amostragens hídricas obtidas das fontes durante a estação chuvosa.

A fonte 5 foi a que apresentou melhores resultados bacteriológicos durante a estação chuvosa, com menores quantidades de bactérias encontradas naturalmente difusas no ambiente (coliformes totais e bactérias heterotróficas), além de ausência de indicador de contaminação fecal (*Escherichia coli*).

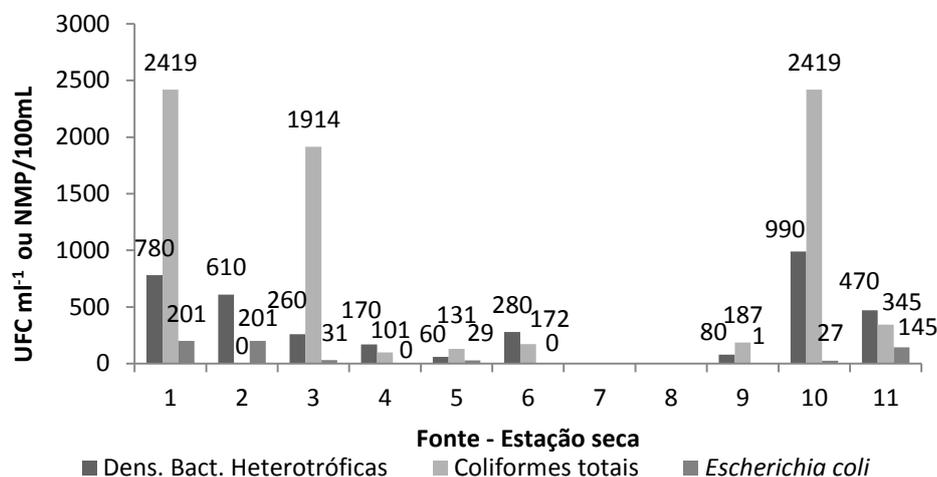


Figura 18 - Resultados das características bacteriológicas (densidade total de bactérias heterotróficas – UFC mL⁻¹, coliformes totais e *Escherichia coli* – NMP/100 mL) em amostragens hídricas obtidas das fontes durante a estação seca

Nota-se, ao observar simultaneamente as figuras 17 e 18, que as fontes 1 e 5 durante estação chuvosa e as fontes 4, 5, 6 e 9 durante a estação seca foram as que, embora impróprias para consumo, apresentaram melhores resultados nas determinações bacteriológicas. .

Martins e Kawakubo (2012) analisaram as características microbiológicas das águas de nove nascentes no município de Alfenas (MG), durante as quatro estações do ano em associação com as formas de uso e ocupação do solo. Diferentemente do presente estudo, a contagem de bactérias heterotróficas não ultrapassou o limite máximo de 500 UFC/mL em nenhuma estação, enquanto que houve detecção de coliformes totais em 71,87% das amostras obtidas nas quatro estações, com incidência maior no outono, onde todos os pontos amostrados apresentaram contagens positivas para esse atributo. Ainda naquele referido estudo, com relação à *Escherichia coli*, a incidência encontrada foi de 34,37% nas nascentes analisadas durante as quatro estações e, semelhante ao presente estudo, apresentou quantidade mais elevada durante o inverno, caracterizado como estação seca. Entretanto, concluíram que os fatores climáticos como temperatura e índice pluviométrico não foram considerados significativos, entretanto, sofreram influências pelas formas de uso e ocupação do solo, infraestrutura e degradação das condições higiênico-sanitárias.

Nesse presente estudo, não foi possível estabelecer a relação entre os resultados microbiológicos e as formas de uso e ocupação do solo, visto que as amostras não foram obtidas diretamente das nascentes, mas sim, de fontes naturais já canalizadas e próximas às áreas urbanas, o que as tornam ainda mais vulneráveis para o consumo por não se conhecer exatamente o ponto de origem nem as condições ao entorno da nascente.

Entretanto, estudos citados por Bartram *et al.* (2003) concluíram que a elevação repentina na contagem de bactérias heterotróficas pode estar associada simultaneamente com contaminação fecal. Em razão disto, a utilização de indicadores específicos devem ser associados. Além disso, estudos epidemiológicos mostraram que, na ausência de contaminação fecal, não existe relação entre os valores isolados da contagem de bactérias heterotróficas e riscos à saúde, embora sugira investigação adicional no que se refere à ingestão da água potável por indivíduos imunocomprometidos.

Entretanto, a presença de bactérias heterotróficas com alto índice de resistência bacteriana pode ser útil para estabelecer o perfil de resistência ambiental, que associados a possibilidade de transferência do gene de resistência para outras espécies bacterianas potencialmente patogênicas podem causar agravos à saúde com chances reduzidas de sucesso em posterior tratamento. Essa preocupação é essencial em estudos de saúde pública já que a proximidade das fontes naturais com as áreas urbanas contribui para o consumo dessas águas.

5.1.1 Teste de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA)

A quantidade de colônias de bactérias heterotróficas amostradas em cada fonte durante as estações chuvosa e seca está demonstrada na tabela 2.

Tabela 2 - Quantidade de colônias de bactérias heterotróficas amostradas por fonte em amostras obtidas durante as estações chuvosa e seca

Fonte	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	Total
Estação chuvosa	12	12	12	10	2	12	12	12	12	12	12	120
Estação seca	12	12	12	12	6	12	*	*	8	12	12	98

(*) amostra não obtida devido à ausência de vazão.

Houve variação no número de amostras por fonte uma vez que nem todas apresentaram crescimento de colônias suficiente para o isolamento proposto (uma cepa por quadrante da placa de ágar PCA em cada três repetições de amostra). As fontes 4 e 5 durante a estação chuvosa e as fontes 5 e 9 durante a estação seca correspondem às fontes com menores números de amostragem bacteriana. Sendo assim, foram amostradas ao todo, 120 cepas na estação chuvosa e 98 cepas na estação seca (Tabela 2).

Para permitir a seleção de grupos representativos de cepas bacterianas da fonte, procurou-se selecionar, sempre que possível colônia com características fenotípicas culturais distintas, conforme detalhado no item 4.2.3.1 da metodologia. Os resultados da análise estatística de similaridade das colônias selecionadas de bactérias heterotróficas, durante as estações chuvosa e seca, estão representados nas Figuras 19 e 20, obtidos por meio de dendrogramas de similaridade.

Constata-se, no dendrograma que representa as colônias isoladas durante a estação chuvosa (Figura 19), a formação de seis grandes grupos com 80% de similaridade fenotípica cultural dos isolados de amostras obtidas das fontes potenciais de consumo do município de Itajubá (MG). Desses, o grupo 4 foi o que apresentou maior número representativo de colônias isoladas durante esta estação.

Pelo dendrograma que representa as cepas isoladas durante a estação seca (Figura 20), verifica-se a formação de nove grandes grupos com 80% de similaridade fenotípica cultural dos isolados de amostras obtidas das fontes potenciais de consumo do município de Itajubá (MG). Desses, o grupo 4 foi o que possuiu maior número representativo de colônias isoladas nesta estação.

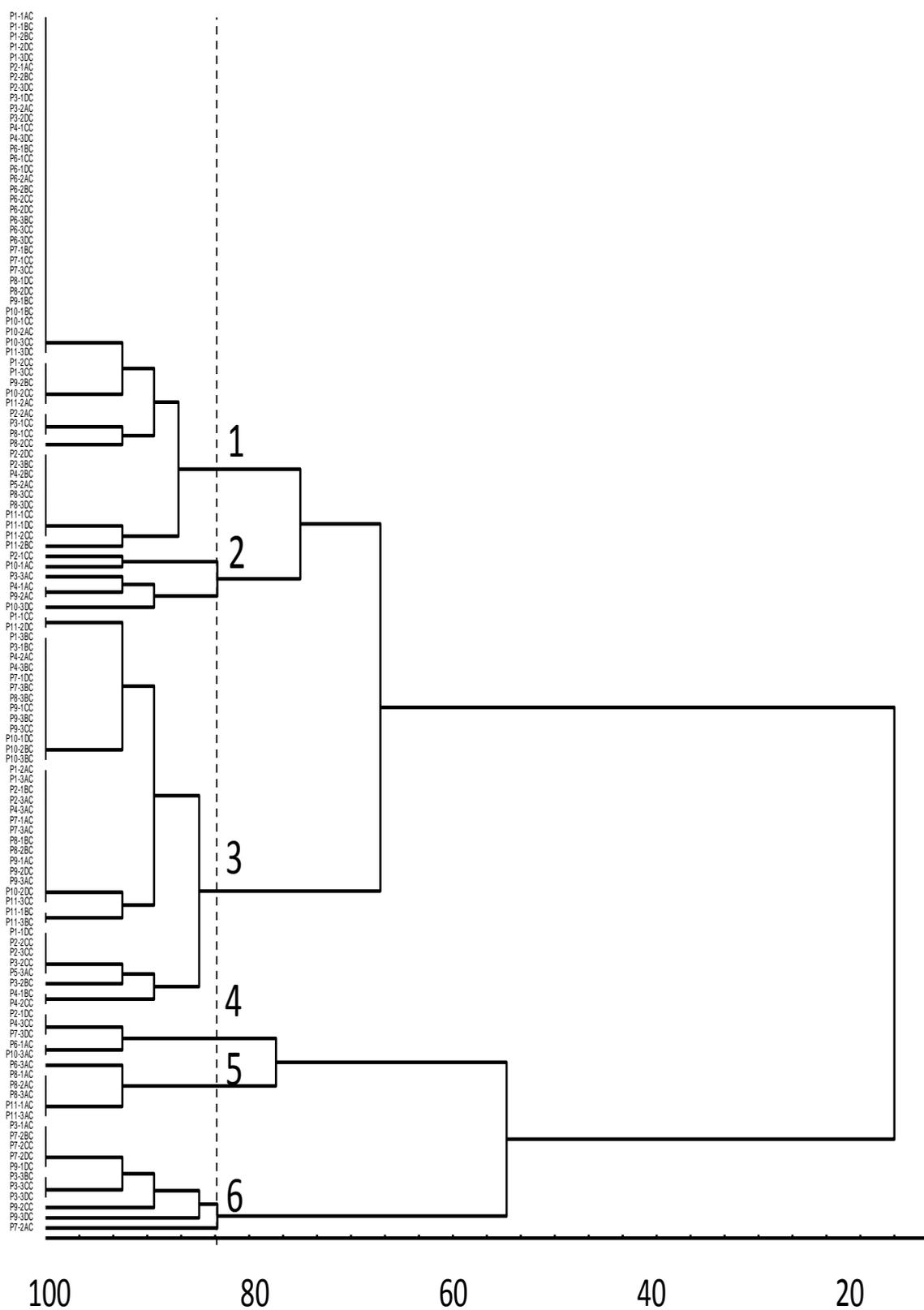


Figura 19 - Dendrograma de similaridade construído por meio das características fenotípicas culturais das colônias selecionadas de bactérias heterotróficas isoladas de amostragens hídricas das onze fontes durante a estação chuvosa. A linha tracejada representa os grupamentos fenotípicos formados com 80% de similaridade.

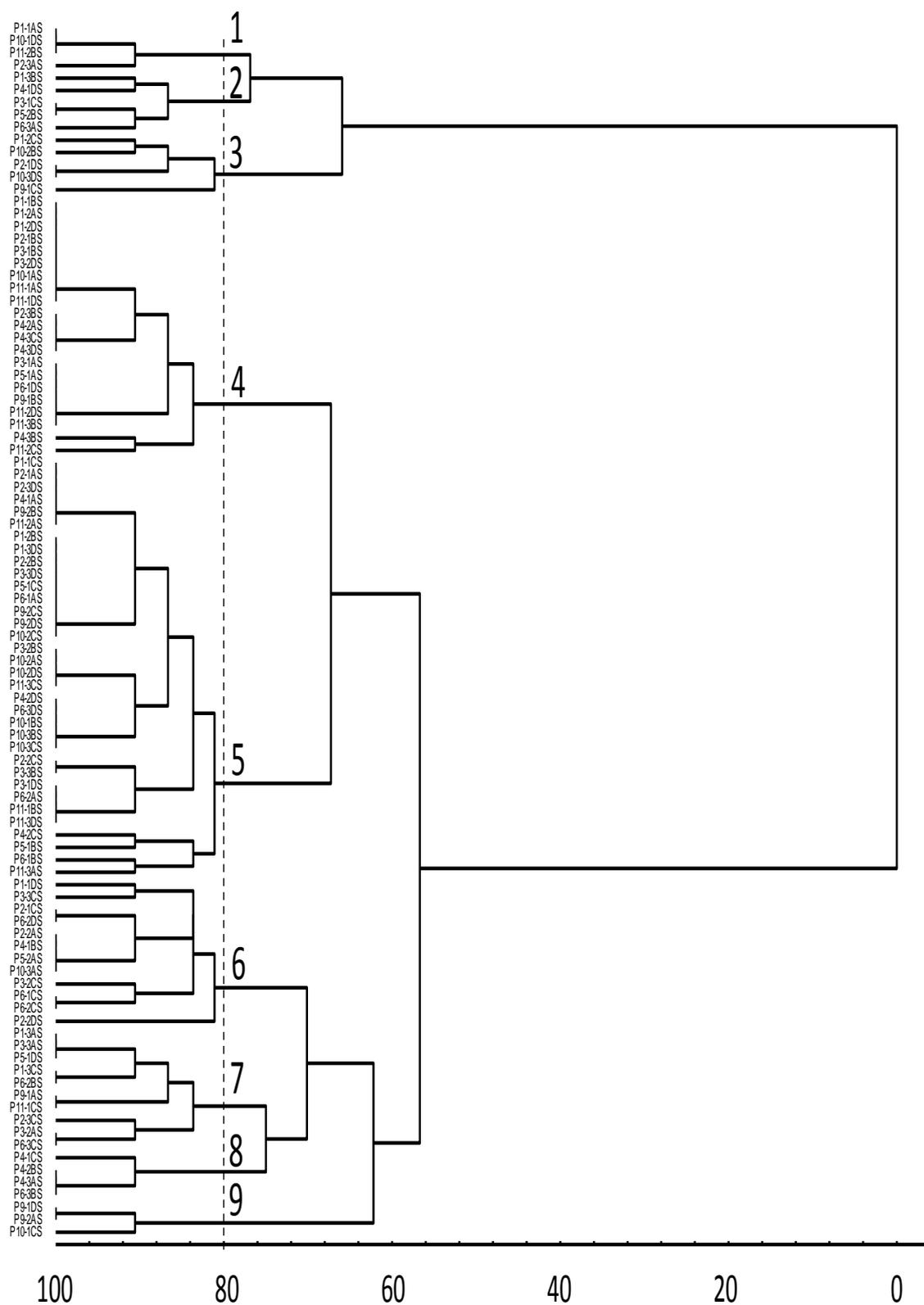


Figura 20 - Dendrograma de similaridade construído por meio das características fenotípicas culturais das colônias selecionadas de bactérias heterotróficas isoladas de amostragens hídricas das nove fontes durante a estação seca. A linha tracejada representa os grupamentos fenotípicos formados com 80% de similaridade.

De acordo com Allen *et al.* (2004), a detecção dos diversos gêneros de bactérias heterotróficas é amplamente variada conforme a escolha do método de cultivo, temperatura de incubação, tempo de incubação, origem da amostra, bem como as estações do ano. No presente estudo, a única variação evidenciada para o cultivo de bactérias heterotróficas diz respeito aos períodos de coleta (chuvoso e seco). Pode-se afirmar que houve maior heterogeneidade fenotípica cultural na estação seca em comparação com a estação chuvosa, devido à formação de maior número de grupamentos heterogêneos, sendo 9 e 6 grupos, respectivamente.

No geral, ambas as estações apresentaram grande homogeneidade fenotípica cultural de bactérias heterotróficas isoladas, superior a 80%, dentro das quais se encontra representada a grande maioria dos grupamentos formados.

Cada colônia isolada dessas bactérias heterotróficas foi, então, submetida ao teste de sensibilidade frente a dez antimicrobianos. Nesse sentido, foram realizados 1200 testes durante a estação chuvosa e 980 testes durante a estação seca, considerando a reação a cada antibiótico um teste. Os resultados obtidos da porcentagem de resistência das colônias isoladas de bactérias heterotróficas, para cada antimicrobiano testado, em cada fonte, durante as estações chuvosa e seca, estão apresentados nas Figuras 21 e 22, respectivamente.

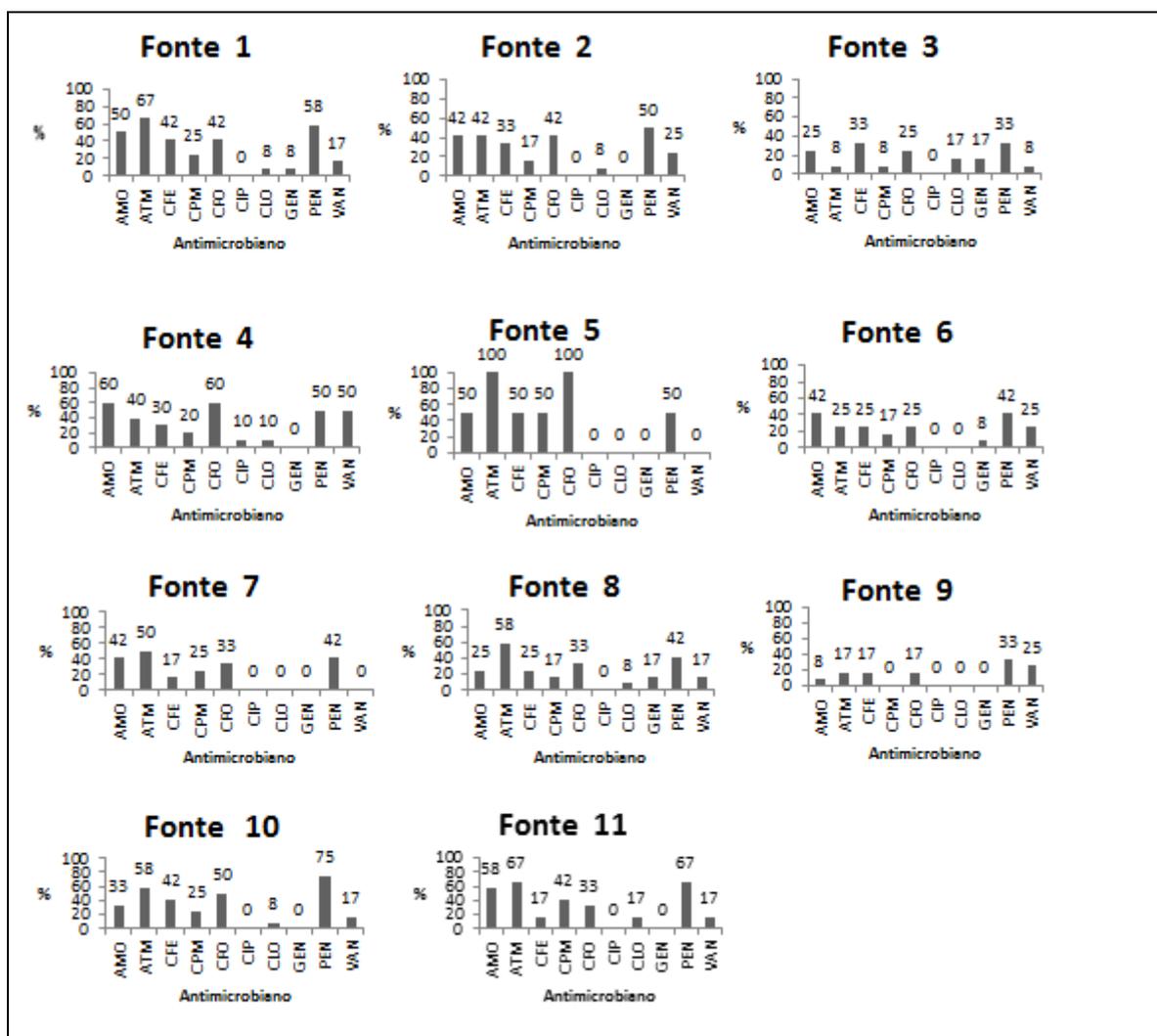


Figura 21 -Percentual de resistência de bactérias heterotróficas por antimicrobianos testados (Amoxicilina - AMO 10 µg, Aztreonam - ATM 30 µg, Cefalexina - CFE 30 µg, Cefepime - CPM 30 µg, Cefoxitina - CFO 30 µg, Ciprofloxacina - CIP 5 µg, Cloranfenicol - CLO 30 µg, Gentamicina - GEN 10 µg, Penicilina G - PEN 10 UI, Vancomicina - VAN 30 µg) em isolados obtidos das onze fontes durante a estação chuvosa.

A água da fonte 10 foi a que apresentou a maior porcentagem de cepas resistentes à penicilina (75%) enquanto que as águas das fontes 3 e 9 foram as que apresentaram a menor porcentagem de cepas resistentes à penicilina (33%). Entretanto, destaca-se a fonte 5, que apresentou 100% das cepas resistentes aos antimicrobianos Aztreonam (ATM) e Cefoxitina (CFO), todos pertencentes à classe dos beta-lactâmicos. Segundo ANVISA (2007a), um dos mecanismos de resistência bacteriana aos beta-lactâmicos ocorre por meio da produção de enzimas beta-lactamases pelas bactérias que atuam impossibilitando a atividade antimicrobiana.

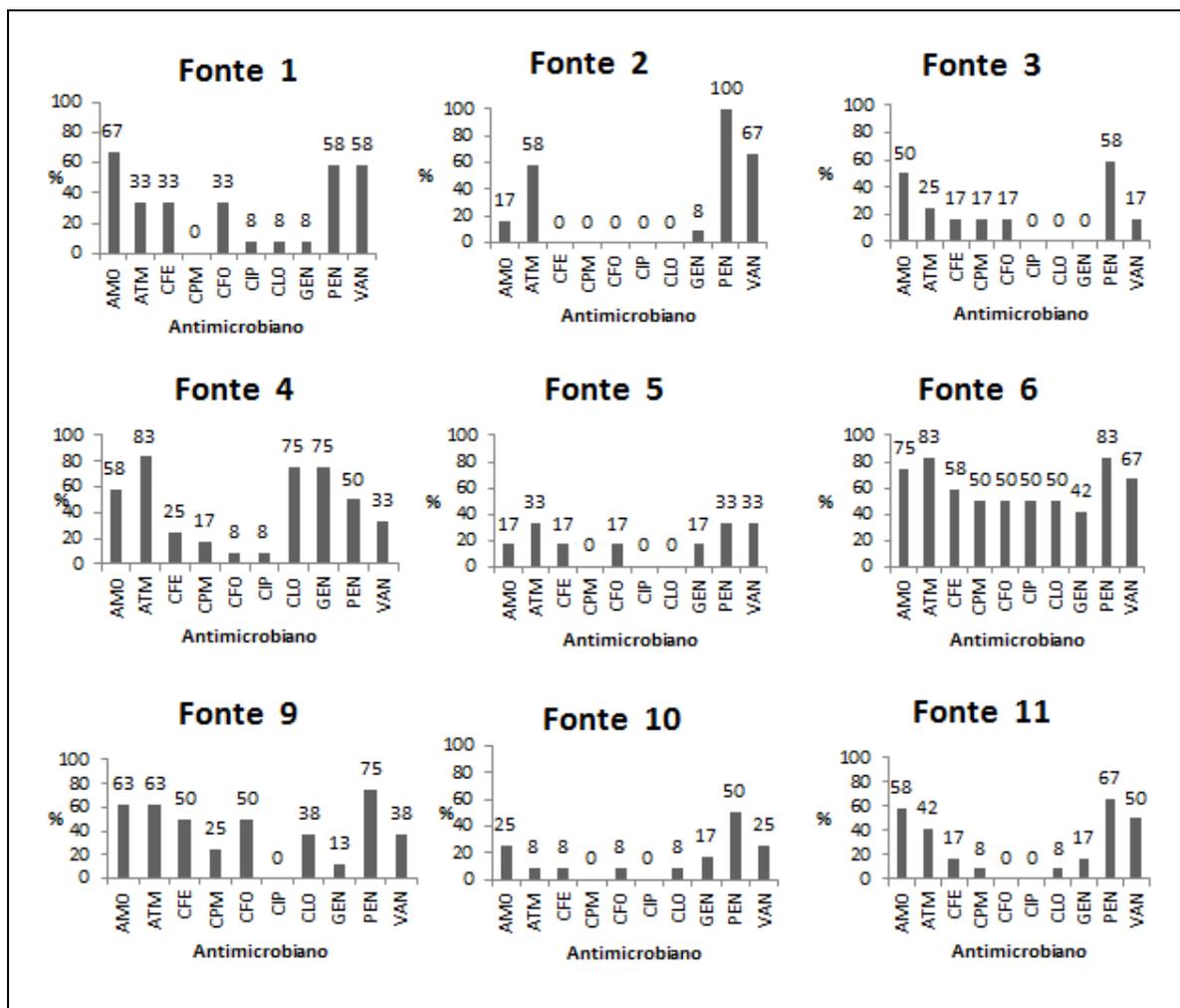


Figura 22 - Percentual de resistência de bactérias heterotróficas por antimicrobianos testados (Amoxicilina - AMO 10 µg, Aztreonam - ATM 30 µg, Cefalexina - CFE 30 µg, Cefepime - CPM 30 µg, Cefoxitina - CFO 30 µg, Ciprofloxacina - CIP 5 µg, Cloranfenicol - CLO 30 µg, Gentamicina - GEN 10 µg, Penicilina G - PEN 10 UI, Vancomicina - VAN 30 µg) em isolados obtidos de nove fontes durante a estação seca.

Destaca-se a fonte 2, cuja água apresentou 100% das cepas testadas resistentes à penicilina. Outra fonte que chamou atenção quanto ao perfil de resistência foi a fonte 6, que apresentou elevadas porcentagens de cepas resistentes, cujo menor valor percentual (42%) refere-se à gentamicina e o maior valor percentual (83%) refere-se aos antimicrobianos aztreonam e penicilina (Figura 22).

A Figura 23 tem por finalidade apresentar a comparação da porcentagem média de resistência de bactérias heterotróficas frente aos antimicrobianos testados entre as estações chuvosa e seca.

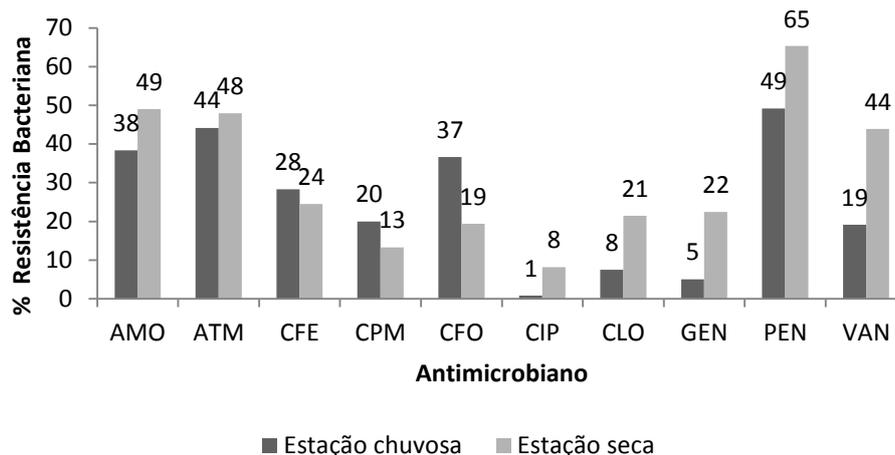


Figura 23 - Porcentagem média de resistência de bactérias heterotróficas, por antimicrobiano, (Amoxicilina - AMO 10 µg, Aztreonam - ATM 30 µg, Cefalexina - CFE 30 µg, Cefepime - CPM 30 µg, Cefoxitina - CFO 30 µg, Ciprofloxacina - CIP 5 µg, Cloranfenicol - CLO 30 µg, Gentamicina - GEN 10 µg, Penicilina G - PEN 10 UI, Vancomicina - VAN 30 µg), em todas as fontes durante as estações chuvosa e seca

É possível observar (Figura 23) que a maior porcentagem média de cepas resistentes (49%) durante a estação chuvosa ocorreu frente ao antimicrobiano penicilina (PEN), seguido pelo antimicrobiano aztreonam (ATM), que apresentou média de 44% de cepas resistentes. O antimicrobiano com menor porcentagem média de cepas resistentes durante a estação chuvosa foi o ciprofloxacino (CIP), cuja resistência média (1%) foi observada apenas na fonte 4. Embora a incidência de resistência ao antimicrobiano ciprofloxacino ainda seja baixa, um estudo realizado por Lopes *et al.* (1998), observou que a presença de bactérias resistentes a esse antimicrobiano (*Klebsiella* spp, *Staphylococcus* spp e *Enterobacter* spp), isoladas por meio de uroculturas no Laboratório de Nefrologia da Universidade Federal da Bahia, foi 2,2 vezes mais elevada entre 1990 e 1994 quando comparadas com o período entre 1985 a 1989. Dessa forma, os autores concluíram que o uso prévio do antimicrobiano é fator importante no desenvolvimento de resistência e isso deve ser sempre considerado em estudos dessa natureza.

Ao analisar a média de resistência de bactérias heterotróficas por classe de antimicrobiano, em cepas isoladas de nove fontes durante a estação seca, nota-se (Figura 23) que os antimicrobianos que proporcionaram maior porcentagem média de cepas resistentes foram a penicilina (PEN) e amoxicilina (AMO), com 65% e 49%, respectivamente. O ciprofloxacina (CIP) também foi o antimicrobiano com menor porcentagem média de resistência (8%) durante a estação seca.

A penicilina foi o antimicrobiano menos eficiente nas duas estações (chuvosa e seca). Segundo Gangle (2005), o predomínio de resistência à penicilina pode ser

explicado devido ao seu uso excessivo desde a descoberta, em 1928, evidenciado por estudos comparativos entre a porcentagem de isolados resistentes à penicilina de hospitais em meados de 1930 e em 2005, cujo aumento de resistência elevou-se de 1 para 90%, respectivamente (GANGLE, 2005). Esse alto índice de resistência à penicilina é preocupante, uma vez que diversos microrganismos considerados patogênicos, incluindo-se a *Escherichia coli*, possuem resistência à penicilina.

Além do perfil de resistência bacteriana, o teste de susceptibilidade também revela o perfil de sensibilidade e sensibilidade intermediária das colônias testadas (Figuras 24 e 25).

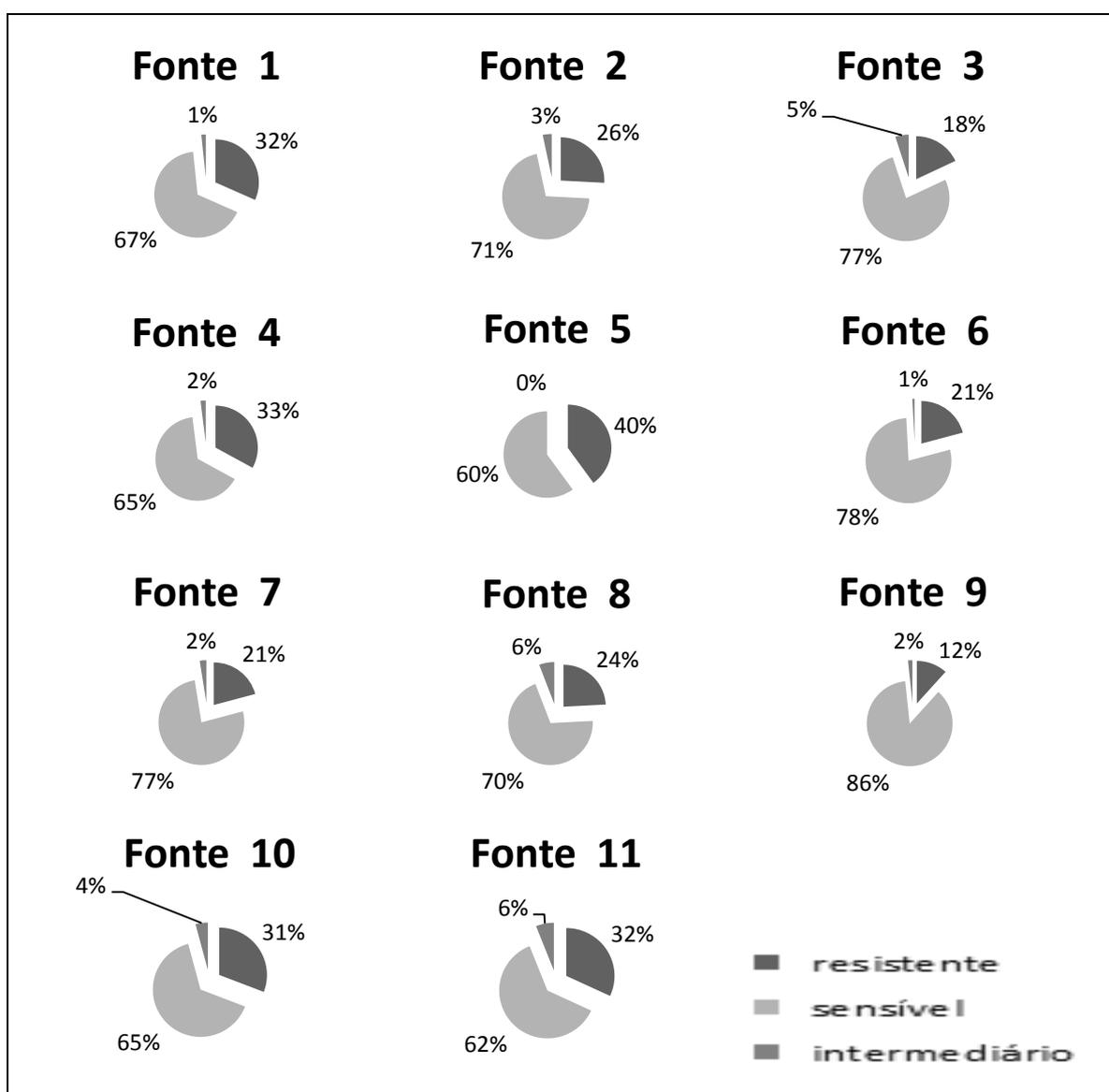


Figura 24 - Percentual de resistência, sensibilidade e sensibilidade intermediária das colônias de bactérias heterotróficas isoladas em amostras obtidas das onze fontes durante a estação chuvosa, frente a antimicrobianos específicos (Amoxicilina - AMO 10 µg, Aztreonam - ATM 30 µg, Cefalexina - CFE 30 µg, Cefepime - CPM 30 µg, Cefoxitina - CFO 30 µg, Ciprofloxacina - CIP 5 µg, Cloranfenicol - CLO 30 µg, Gentamicina - GEN 10 µg, Penicilina G - PEN 10 UI, Vancomicina - VAN 30 µg)

De acordo com a Figura 24, as águas das fontes durante a estação chuvosa com maior porcentagem de resistência bacteriana foram as de número 5, com 40% dos testes resistentes, e a fonte 4 com 33% dos testes resistentes, lembrando que a fonte 5 apresentou melhor resultado microbiológico nas densidades bacterianas. Em contraste, a fonte 9 foi a que apresentou menor porcentagem de testes resistentes, uma vez que das 12 cepas isoladas e testadas com os 10 antimicrobianos citados (120 testes), obtiveram-se apenas 14 (12%) resistentes.

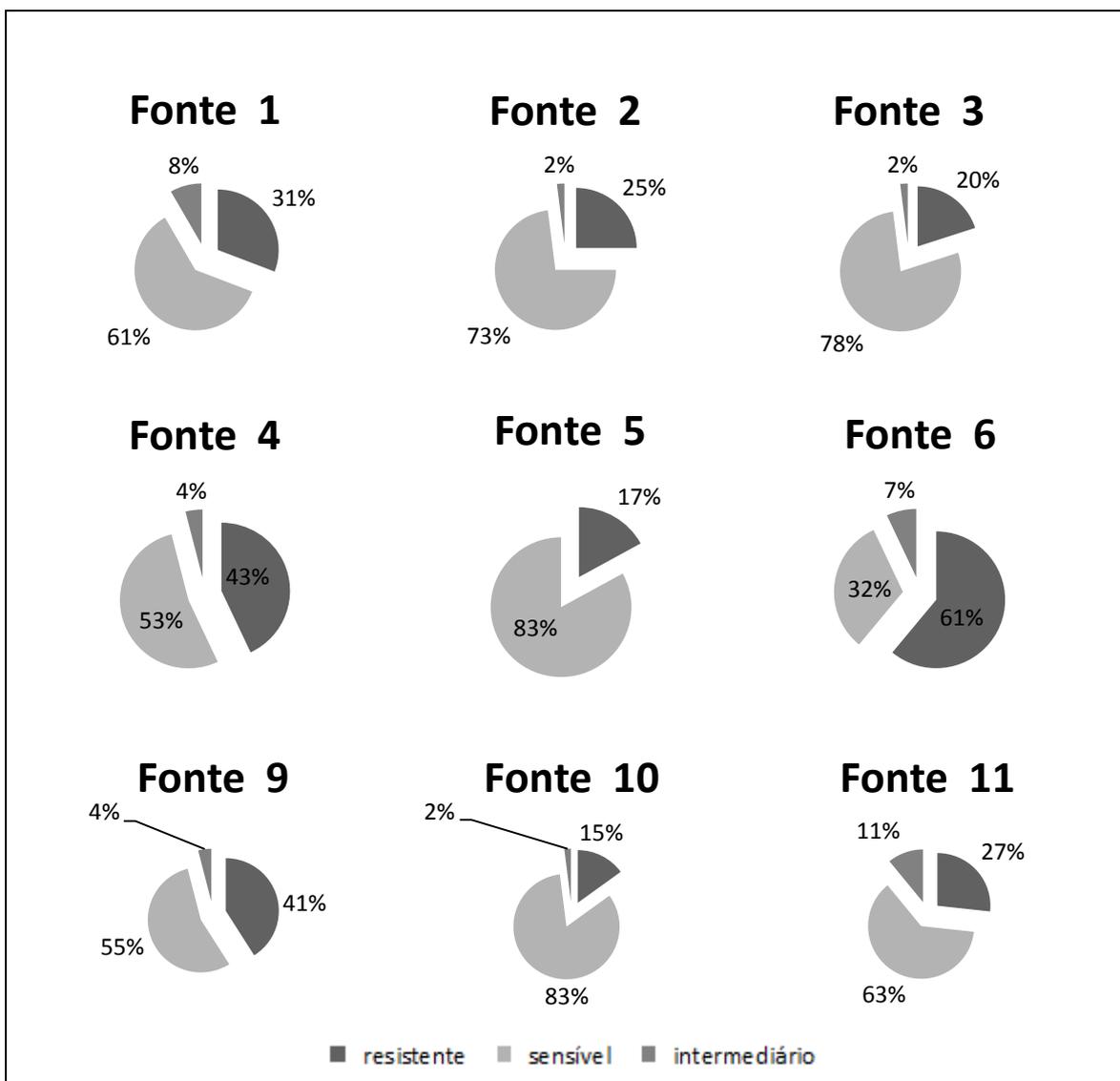


Figura 25 - Percentual de resistência, sensibilidade e sensibilidade intermediária das colônias de bactérias heterotróficas isoladas em amostras obtidas das nove fontes, na estação seca, frente a antimicrobianos específicos (Amoxicilina - AMO 10 µg, Aztreonam - ATM 30 µg, Cefalexina - CFE 30 µg, Cefepime - CPM 30 µg, Cefoxitina - CFO 30 µg, Ciprofloxacina - CIP 5 µg, Cloranfenicol - CLO 30 µg, Gentamicina - GEN 10 µg, Penicilina G - PEN 10 UI, Vancomicina - VAN 30 µg)

Em relação ao perfil de resistência de bactérias heterotróficas, por fonte durante a estação seca, observa-se na figura 25, que as fontes 6 e 4 apresentaram as maiores porcentagens de resistência, 61% e 43%, respectivamente. Em contraste, a fonte com menor porcentagem de bactérias heterotróficas resistentes, no período de coleta da estação seca, foram as presentes nas águas das fontes 10 e 5, com 15% e 17%, respectivamente.

Todas as fontes citadas com elevadas porcentagens de resistência bacteriana, tanto na estação chuvosa (5 e 4), como na estação seca (6 e 4) são rotineiramente utilizadas para consumo, sem tratamento prévio. Considerando a elevada porcentagem de resistência apresentada em algumas fontes e que aproximadamente 80% delas apresentaram contaminação com *Escherichia coli* (indicador de contaminação fecal), evidencia-se a vulnerabilidade de contaminação e o risco de ingestão de águas provenientes dessas fontes em seu estado bruto.

A fonte 4 manteve a segunda colocação com maior porcentagem de resistência de bactérias heterotróficas dentre os testes efetuados com antimicrobianos específicos durante as duas estações, enquanto que a fonte 5, apesar de possuir um número reduzido de cepas testadas devido a baixa densidade de bactérias heterotróficas nas duas estações, apresentou a maior porcentagem de cepas resistentes durante a estação chuvosa e a menor porcentagem de resistência durante a estação seca.

Diante disto, ao analisar as fontes isoladamente, não se observa relação entre os períodos de estação chuvoso e seco com o perfil de resistência de bactérias heterotróficas. No entanto, ao analisar a porcentagem média de resistência obtida em todas as fontes de cada estação, foi possível observar (Figura 26) que a estação seca apresentou tendência de maiores porcentagens de colônias de bactérias heterotróficas resistentes aos antimicrobianos (31%) do que a estação chuvosa (26%).

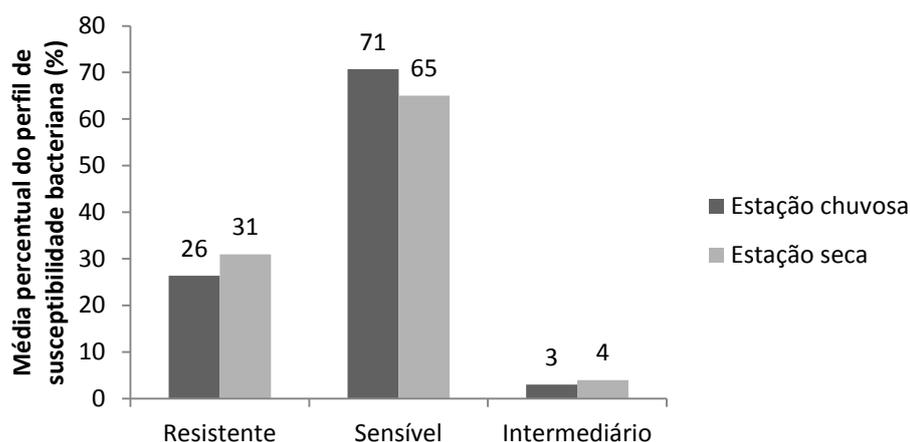


Figura 26 - Média percentual do perfil de susceptibilidade bacteriana (resistência, sensibilidade e sensibilidade intermediária) realizado em colônias de bactérias heterotróficas isoladas em amostras hídricas obtidas das fontes durante as estações chuvosa e seca

Para facilitar a análise geral, os resultados de todas as características microbiológicas, incluindo o perfil de resistência bacteriana, foram agrupadas no quadro 11.

Quadro 11 - Resultados das características microbiológicas (densidade total de bactérias heterotróficas, coliformes totais e *Escherichia coli*), incluindo o perfil de resistência bacteriana, em amostras hídricas obtidas de fontes do município de Itajubá (MG), durante as estações chuvosa e seca

Fonte	CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS							
	Densidade total heterotróficas (UFC mL ⁻¹)		Coliformes totais (NMP/100 mL)		<i>Escherichia coli</i> (NMP/100 mL)		Resistência heterotróficas (%)	
	Chuvosa	Seca	Chuvosa	Seca	Chuvosa	Seca	Chuvosa	Seca
1	60	780	94	2419	6	200	32	31
2	1223	610	1985	2419	22	200	26	25
3	150	260	664	1914	9	31	18	20
4	2520	170	267	100	0	0	33	43
5	7	60	13	131	0	29	40	17
6	90	280	472	172	1	0	21	61
7	567	-	2275	-	21	-	21	-
8	690	-	1031	-	5	-	24	-
9	2163	80	2419	187	1	1	12	41
10	437	990	2419	2419	84	27	31	15
11	143	470	884	345	22	144	32	27
Média	755	411	1024	1123	16	70	26	31

Notas: Em negrito: valores mais altos para o referido atributo; em cinza: estação com predominância de fontes com valores mais elevados e, em vermelho: estação com predominância de valores médios mais elevados entre todas as fontes (exceção das fontes 7 e 8, devido ausência de amostragem). Valores arredondados.

Em termos gerais, desconsiderando-se os resultados obtidos nas fontes 7 e 8 durante a estação chuvosa (para permitir a comparação entre as estações, já que essas não apresentaram vazão na estação seca), observou-se (Quadro 11), por meio da comparação entre as fontes nos dois períodos, maior número de fontes contendo densidades mais elevadas de bactérias heterotróficas e *Escherichia coli* durante a estação seca, equivalência no número de fontes com densidades maiores de coliformes totais entre as estações e maior número de fontes contendo porcentagens mais altas de resistência bacteriana a antibióticos na estação chuvosa. Entretanto, ao analisar a média obtida entre todas as fontes em cada estação, nota-se tendência maior de densidade de bactérias heterotróficas durante a estação chuvosa e maiores porcentagens de resistência durante a estação seca. Observa-se também relação negativa entre resistência bacteriana e densidade total de bactérias heterotróficas.

Entretanto, faz-se necessário outro tipo de análise estatística que permita observar, por meio de análise simultânea, todas as características observadas no presente estudo. Esse procedimento foi feito por meio da análise de componentes principais, cujos resultados serão apresentados posteriormente.

5.2 Resultados físicos e químicos

Os resultados da média aritmética referente as características físicas e químicas das amostras de água obtidas nas estações chuvosa e seca, das diferentes fontes, estão representadas nas tabelas 3 e 4, respectivamente.

Tabela 3 - Resultados da média das características físicas e químicas das amostragens hídricas obtidas das onze fontes durante a estação chuvosa

Fonte	Cond. ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	O ₂ dissolv. (mg L^{-1})	pH	Turbidez (NTU)	Acidez ($\text{mg CaCO}_3\text{L}^{-1}$)	Alcalinidade ($\text{mg CaCO}_3\text{L}^{-1}$)	Dureza ($\text{mg CaCO}_3\text{L}^{-1}$)	Carbono Orgânico Total (mg L^{-1})	Sólidos Totais (mg L^{-1})	Sólidos Totais Voláteis (mg L^{-1})
1	89,97	6,43	7,3	0,86	10,67	44,00	29,18	0,00	115,56	27,78
2	46,37	6,14	8,0	1,50	8,00	21,33	15,36	0,73	110,00	60,00
3	113,43	6,24	7,4	0,73	12,00	41,33	29,95	0,00	120,00	32,22
4	118,87	5,42	7,2	0,24	36,00	69,33	33,79	0,00	143,33	15,56
5	28,50	3,71	6,2	0,23	32,00	18,67	9,22	0,00	44,44	8,89
6	89,17	4,45	6,9	0,26	38,67	108,00	33,79	0,00	162,22	45,56
7	35,23	7,85	6,0	2,83	30,67	22,67	16,90	0,00	51,11	22,22
8	40,37	7,77	6,3	2,10	26,67	12,00	0,00	0,00	44,44	13,33
9	16,93	10,60	7,8	3,20	9,33	17,33	13,82	0,00	74,44	31,11
10	56,83	10,48	8,2	5,04	12,00	40,00	23,04	0,28	115,56	47,78
11	116,97	9,67	6,5	0,81	36,00	14,67	27,65	0,00	181,11	127,78

Notas: Destacados em cinza: características solicitadas na Portaria MS 2914/11 como critério de potabilidade (pH 6-9,5; turbidez VMP 5,0 NTU; dureza VMP 500,0 $\text{CaCO}_3\text{L}^{-1}$; sólidos totais VPM 1000,0 mg L^{-1}); em vermelho: valor acima do estabelecido na portaria supracitada e, em negrito: os valores mais elevados obtidos em cada atributo na respectiva fonte. Considera-se VMP como o valor máximo permitido.

Tabela 4 - Resultados da média referente as características físicas e químicas das amostragens hídricas obtidas das nove fontes durante a estação seca

Fonte	Cond. ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	O ₂ dissolv. (mg L^{-1})	pH	Turbidez (NTU)	Acidez ($\text{mg CaCO}_3\text{L}^{-1}$)	Alcalinidade ($\text{mg CaCO}_3\text{L}^{-1}$)	Dureza ($\text{mg CaCO}_3\text{L}^{-1}$)	Carbono Orgânico Total (mg L^{-1})	Sólidos Totais (mg L^{-1})	Sólidos Totais Voláteis (mg L^{-1})
1	77,10	9,64	7,27	0,66	49,33	29,60	55,30	8,42	110,00	40,00
2	68,50	9,37	7,14	0,60	33,33	25,33	33,79	9,70	133,33	40,00
3	61,40	9,67	7,09	0,60	38,00	25,20	62,98	10,88	113,33	33,33
4	86,60	9,38	6,62	0,18	46,00	32,20	61,44	9,98	130,00	23,33
5	38,70	9,55	7,02	0,30	34,00	28,00	30,72	8,19	83,33	56,67
6	53,30	9,28	7,29	2,02	44,00	24,20	32,26	7,41	76,67	36,67
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	21,30	9,17	8,25	0,90	26,67	26,67	23,04	8,51	36,67	3,33
10	67,60	9,20	8,53	2,70	42,67	28,40	69,12	*	103,33	43,33
11	141,60	9,45	7,38	0,60	30,00	29,33	35,33	5,47	120,00	53,33

Notas: Destacados em cinza as características solicitadas na Portaria MS 2914/11 como critério de potabilidade (pH 6-9,5; turbidez VMP 5,0 NTU; dureza VMP 500,0 $\text{CaCO}_3\text{ L}^{-1}$; sólidos totais VPM 1000,0 mg L^{-1}) e, em negrito: os valores mais elevados obtidos em cada atributo na respectiva fonte. Considera-se VMP como o valor máximo permitido.

(*) Valor não detectável.

Observa-se, na tabela 3, que as fontes que apresentaram valores mais elevados nas amostragens obtidas durante a estação chuvosa foram: fonte 2 para o Carbono Orgânico Total ($0,73 \text{ mg L}^{-1}$); fonte 4 para condutividade ($118,87 \text{ } \mu\text{S cm}^{-1}$); fontes 4 e 6 para dureza ($33,79 \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$), fonte 6 simultaneamente para acidez e alcalinidade ($38,67 \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ e $108,00 \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$), respectivamente; fonte 9 para oxigênio dissolvido ($10,60 \text{ mg L}^{-1}$); fonte 10 para pH e turbidez (8,20 e 5,04 NTU), respectivamente; e fonte 11 para sólidos totais e sólidos totais voláteis ($181,11$ e $127,78 \text{ mg L}^{-1}$), respectivamente. A relação entre a qualidade hídrica e a importância de cada característica encontra-se descrito mais adiante.

Observa-se, na tabela 4, que as fontes que apresentaram valores mais elevados nas amostragens obtidas durante a estação seca foram: fonte 1 para acidez ($49,33 \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$); fonte 2 para sólidos totais ($133,33 \text{ mg L}^{-1}$); fonte 3 para oxigênio dissolvido e carbono orgânico total ($9,67 \text{ mg L}^{-1}$ e $10,88 \text{ mg L}^{-1}$), respectivamente; fonte 4 para alcalinidade ($32,20 \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$); fonte 10 simultaneamente para pH, turbidez e dureza (8,53; 2,70 NTU e $69,12 \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$), respectivamente; e fonte 11 para sólidos totais voláteis ($53,33 \text{ mg L}^{-1}$). Assim como na estação chuvosa, a fonte que apresentou valor mais alto para o atributo pH coincidiu com aquela com valor mais elevado para turbidez, sendo 14% e 50% da variação de turbidez.

Para facilitar a análise comparativa dos resultados químicos e físicos entre as estações, os valores foram dispostos nas Figuras 27 e 28 que contêm os respectivos gráficos com os valores simultâneos entre as estações. Entretanto, convém ressaltar que não houve comparação entre as fontes 7 e 8 devido à ausência de vazão durante a estação seca.

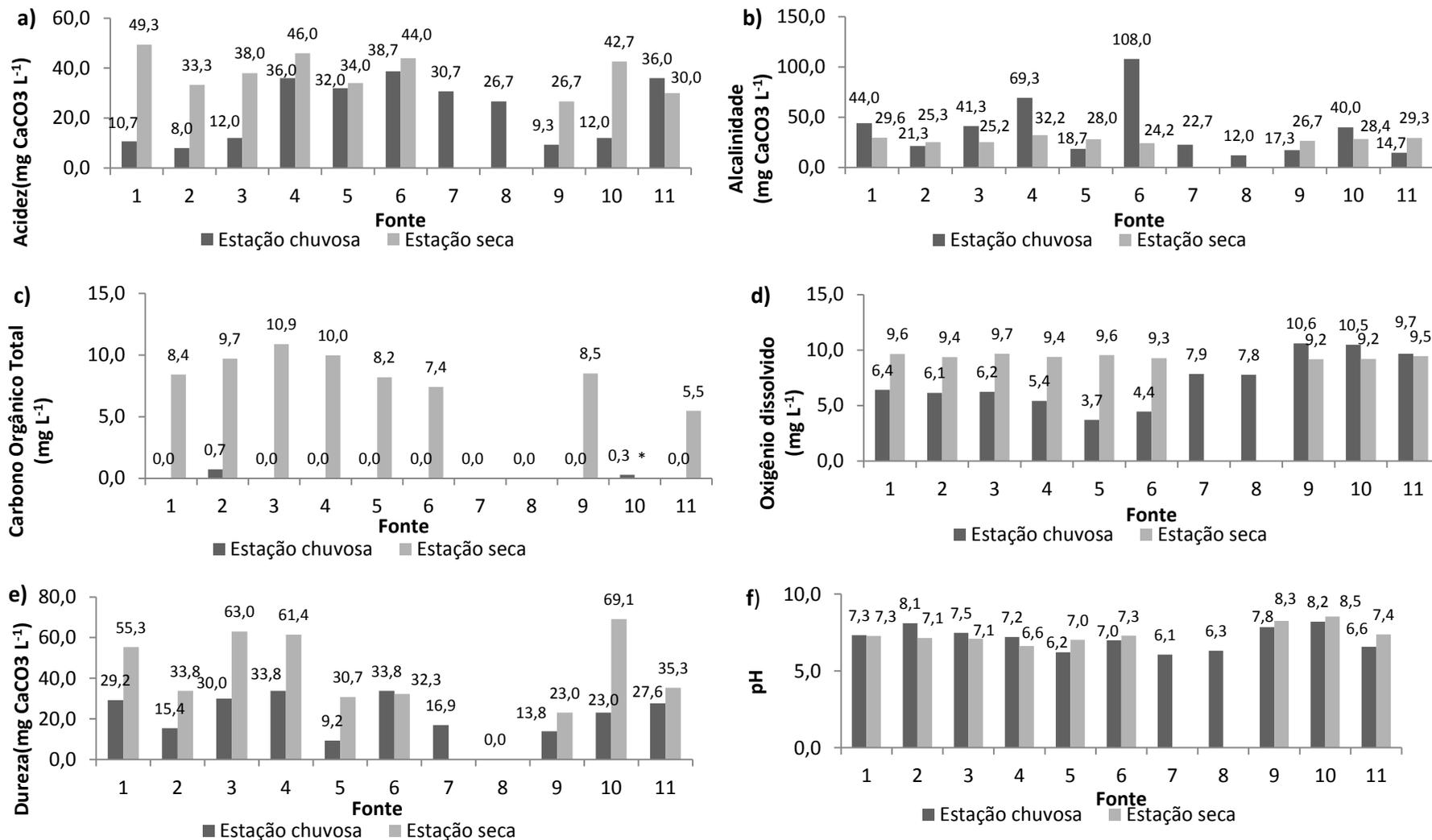


Figura 27 - Gráficos comparativos por resultados das características químicas entre as estações chuvosa e seca, sendo: a) acidez; b) alcalinidade; c) carbono orgânico total; d) oxigênio dissolvido; e) dureza e f) pH.

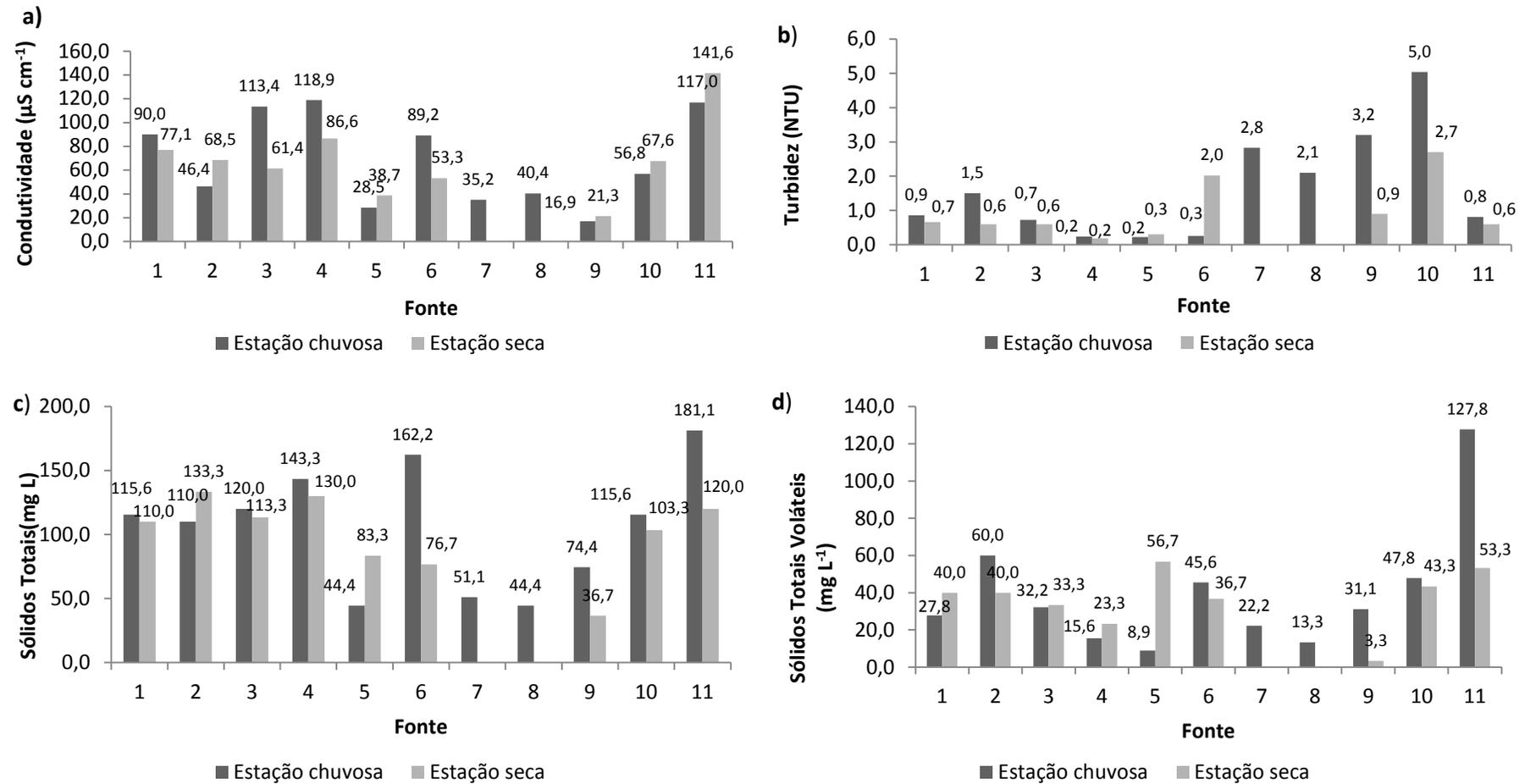


Figura 28 - Gráficos comparativos por resultados das características físicas entre as estações chuvosa e seca, sendo: a) condutividade; b) turbidez; c) sólidos totais e; d) sólidos totais voláteis.

Constata-se (Figura 27a) que a determinação de acidez foi consideravelmente mais elevada durante a estação seca, provavelmente decorrente de acidez carbônica. Todas as águas das fontes durante a estação seca apresentaram valores de pH entre 4,5 e 8,2, com exceção da fonte 10 (pH 8,5). A determinação da acidez hídrica reflete a capacidade da água em neutralizar bases causando o efeito de tamponamento e ocorre devido à presença de gás carbônico livre na água (SPERLING, 2005). Assim, sua origem pode ser tanto por fontes naturais como, por exemplo, resultado da decomposição da matéria orgânica e absorção de CO₂ atmosférico, como decorrente de contaminação antropogênica por meio do lançamento de efluentes industriais. Entretanto, a distribuição das formas de acidez pode ser identificada por meio do pH, onde valores de pH acima de 8,2 indicam ausência de CO₂ livre, valores de pH compreendidos entre 4,5 e 8,2 indicam acidez carbônica e abaixo de 4,5 indicam acidez proveniente de ácidos fortes, geralmente decorrente de efluentes industriais (BRASIL, 2006).

Nenhuma das fontes apresentou determinações elevadas de alcalinidade, entretanto, valores abaixo do comum para águas naturais (< 30 mg L⁻¹ de CaCO₃) foram observados nas fontes 2, 5, 7, 8, 9 e 11 obtidos durante a estação chuvosa e em quase todas as fontes analisadas durante a estação seca, exceto a água da fonte 4 (Figura 27b). A determinação da alcalinidade hídrica reflete a capacidade da água em neutralizar ácidos causando efeito de tamponamento (SPERLING, 2005). A alcalinidade da água é expressa em carbonato de cálcio e reflete o conjunto das formas de alcalinidade existente por meios de sais do ácido carbônico (hidróxidos, carbonatos e bicarbonatos). Em geral, as águas naturais apresentam valores compreendidos entre 30 e 500 mg L⁻¹ de CaCO₃. Valores elevados de alcalinidade relacionam-se com processos de decomposição da matéria orgânica e elevada taxa respiratória de microrganismos que culminam com a liberação e dissolução de gás carbônico na água, entretanto podem elevar-se também por ações antropogênicas por meio do lançamento de efluentes industriais a base de soda cáustica e cal hidratada (BRASIL, 2006; CETESB, 2013). De acordo com Sperling (2005), a alcalinidade da água não tem relevância sanitária como critério de potabilidade, porém pode conferir gosto amargo durante a ingestão.

De acordo com a figura 27c, observa-se que a concentração de carbono orgânico total foi mais elevada durante a estação seca, sendo o maior valor (10,9 mg L⁻¹) encontrado na fonte 3. Resultado semelhante foi apresentado por Carvalho (2015), ao analisar a qualidade hídrica em águas de nascentes na microbacia do ribeirão José Pereira no município de Itajubá (MG), com justificativa baseada na hipótese de concentração

deste atributo no ambiente aquático devido ao baixo índice de precipitação típico do período. De acordo com a Cetesb (2013), o carbono orgânico encontrado em água doce provém da matéria viva e é utilizado por bactérias e algas como fonte de energia. Entretanto, o lançamento de efluentes e resíduos constituem fontes antropogênicas de carbono orgânico no ambiente aquático e sua determinação é indicadora de poluição hídrica. O carbono orgânico total contém frações biodegradáveis e não biodegradáveis (CETESB, 2013). A fração mais facilmente degradável do carbono orgânico total é denominada carbono orgânico assimilável, de baixo peso molecular, e representa apenas 0,1 a 9% do carbono orgânico total (ROCHA, 2007). Segundo esse mesmo autor, a matéria orgânica biodegradável constitui fator limitante para o crescimento de bactérias heterotróficas e considera correlação significativa entre carbono orgânico assimilável e densidade de bactérias heterotróficas na água.

Observa-se na figura 27d que as fontes 5 e 6, durante a estação chuvosa, apresentaram valores inferiores a $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ de oxigênio dissolvido e que, de um modo geral, os valores deste atributo foram maiores durante a estação seca, com exceção das fontes 9, 10 e 11, que apresentaram valores ligeiramente mais elevados durante a estação chuvosa. De acordo com a Resolução CONAMA 357/05 são necessários, no mínimo, $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ de oxigênio para garantir a preservação da vida aquática. A presença de oxigênio dissolvido garante a vida no ambiente aquático e sua determinação é considerada um dos parâmetros mais importantes para avaliar a qualidade do meio hídrico (BRASIL, 2006). Segundo esse mesmo autor, a concentração de oxigênio dissolvido é inversamente proporcional à poluição hídrica devido ao seu consumo durante o processo de decomposição de compostos orgânicos por microrganismos aeróbios. Por essa razão, de acordo com Sperling (2005), a determinação deste atributo torna-se útil para identificar a poluição ocorrida por meio de despejos orgânicos. As fontes naturais de oxigênio dissolvido na água provêm da dissolução do oxigênio atmosférico e da fotossíntese, enquanto que a aeração artificial e a eutrofização constituem fontes diretas e indiretas de incorporação de oxigênio no meio aquático (SPERLING, 2005). Diante disso, chama-se a atenção para o fato de que a determinação isolada de oxigênio dissolvido em águas eutrofizadas poderá oferecer resultados enganosos do grau de poluição hídrica (CETESB, 2013).

A Figura 27e apresenta os valores obtidos de dureza total das amostras de água obtidas das fontes durante as estações chuvosa e seca. Com exceção da fonte 6, que apresentou valor de dureza ligeiramente maior durante a estação chuvosa, todas as

demais fontes apresentaram valores mais elevados para este atributo durante a estação seca, o que pode ser decorrente da concentração causada pela diminuição do volume hídrico. A dureza da água é definida por sua capacidade em precipitar sabão por meio da presença de cátions, principalmente cálcio e magnésio, associados a ânions, principalmente o bicarbonato. A fonte de dureza da água de origem natural ocorre por meio do gás carbônico presente na água que, durante sua passagem pelo solo, provoca a dissolução de rochas calcárias, ricas em cálcio e magnésio. Por essa razão, águas subterrâneas apresentam valores mais elevados de dureza do que águas superficiais. Outra fonte de dureza, que acomete as águas superficiais, dessa vez de origem antropogênica, ocorre por meio do lançamento de efluentes industriais (CETESB, 2013). A dureza total da água, em mg L^{-1} de equivalente em carbonato de cálcio (CaCO_3), pode ser classificada em mole ou branda, quando menor que 50 mg L^{-1} de CaCO_3 ; moderada, quando entre 50 e 150 mg L^{-1} de CaCO_3 ; dura, quando entre 150 e 300 mg L^{-1} de CaCO_3 e muito dura, quando maior que 300 mg L^{-1} de CaCO_3 (BRASIL, 2006). A Portaria 2914/11 define como critério de potabilidade o valor máximo permitido de 500 mg L^{-1} de CaCO_3 para este atributo, embora dificilmente consiga-se encontrar este grau de dureza em águas superficiais do Brasil. Segundo Sperling (2005), a dureza está relacionada com incrustações em tubulações, entretanto não há evidência entre dureza e problemas sanitários, porém em determinadas concentrações pode conferir sabor desagradável e efeitos laxativos. Além disso, há evidências de efeitos benéficos frente ao consumo de águas duras como fator protetor de doenças cardiovasculares (SPERLING, 2005; BRASIL, 2006). A maioria das águas obtidas das fontes foi considerada como mole ou branda (dureza menor que 50 mg L^{-1} de CaCO_3 , exceto as águas das fontes 1, 3, 4 e 10 obtidas durante a estação seca, consideradas moderada (dureza entre 50 e 150 mg L^{-1}). Entretanto, todas as fontes, em ambas as estações, apresentaram valores de dureza determinados na água bruta dentro do valor máximo permitido pela portaria vigente de potabilidade. Resultado semelhante foi apresentado por Gasparotto (2011), ao analisar a qualidade hídrica de oito nascentes urbanas no município de Piracicaba (SP) e constatou que nenhuma nascente apresentou dureza acima do limite máximo permitido.

Observa-se na figura 27f que embora cinco das nove fontes tenham apresentado valores de pH ligeiramente mais elevados durante a estação seca, todas as águas das fontes, em ambas as estações, apresentaram valores dentro da faixa ideal para o ambiente natural ($6 - 9$) e para a recomendação da portaria de potabilidade vigente ($6 - 9,5$). Diante disto, não se pode afirmar que houve influência das estações chuvosa e seca na

determinação destes valores. Resultado semelhante foi apresentado por Donadio, Galbiatti e Paula (2005), ao analisarem a qualidade da água de quatro nascentes na bacia hidrográfica do Córrego Rico (SP), concluindo que não houve influência dos períodos chuvoso e seco nos seus valores. O potencial hidrogeniônico (pH) reflete as condições de acidez e alcalinidade do meio por meio da medição da concentração de íons hidrogênio (H^+). O intervalo de medição pode variar de 0 a 14 sendo que valores inferiores a 7 representam condições ácidas e valores superiores a 7 representam condições alcalinas. Segundo o texto sobre vigilância e controle da qualidade da água para consumo do Ministério da Saúde (2006), as variações de pH em águas naturais ocorrem por meio de processos naturais (fotossíntese, dissolução de rochas) ou processos antropogênicos (lançamento de efluentes), entretanto, para manter o equilíbrio da vida aquática, o pH deve compreender a faixa entre 6 e 9. Entretanto, a Portaria MS 2914/11 recomenda que o pH da água para consumo seja mantido entre 6 e 9,5 no sistema de distribuição, isto porque valores extremos de pH voltados para a acidez apresentam grande potencial corrosivo enquanto que a intensa alcalinidade provoca incrustações. De acordo com Sperling, (2005), o pH da água não causa implicações para a saúde pública, exceto quando se determinam valores extremos a ponto de causar irritação na pele e olhos.

Os resultados da condutividade determinada no presente estudo (Figura 28 a) demonstram que as fontes 3 e 4 durante a estação chuvosa e a fonte 11 durante as estações chuvosa e seca foram as que apresentaram medições acima de $100 \mu S cm^{-1}$. A fonte que apresentou menores valores de condutividade nas amostras de água foi a 9, ($16,9$ e $21,3 \mu S cm^{-1}$), nas estações chuvosa e seca, respectivamente. Valores elevados para este atributo foram encontrados em ambas as estações, porém com predominância durante a estação seca. A redução do volume hídrico durante a estação seca pode ser uma das causas de concentração deste atributo. A condutividade é a expressão da capacidade hídrica em conduzir eletricidade medida em função da concentração de sais (BRASIL, 2006; CETESB, 2013). Em águas naturais, é comum encontrar valores entre 10 e $100 \mu S cm^{-1}$, entretanto, de acordo com a Cetesb (2013), níveis superiores a $100 \mu S cm^{-1}$ já estão relacionados com ambientes impactados, podendo atingir até $1000 \mu S cm^{-1}$ em caso de poluição com esgotos tanto domésticos como industriais (BRASIL, 2006).

De um modo geral, observaram-se (Figura 28b) valores mais elevados de turbidez durante a estação chuvosa, com exceção da fonte 6 que apresentou menor valor nessa época. A determinação deste atributo é requerida pela Portaria 2914/11 do Ministério da Saúde como critério de potabilidade, cujo valor máximo permitido após

tratamento é de 5 unidades nefelométricas de turbidez (UNT) . Entretanto, somente a fonte 10 durante a estação chuvosa apresentou turbidez acima do limite de potabilidade (5,04 UNT). A turbidez hídrica reflete a presença de sólidos orgânicos (ex. bactérias e algas) e inorgânicos (ex. areia e argila) em suspensão (CETESB, 2013). A causa da turbidez pode ser natural, ou seja, em decorrência de altos índices pluviométricos e das características geológicas próprias das bacias, ou de origem antropogênica, em decorrência do lançamento de esgotos tanto domésticos como industriais (BRASIL, 2006). Sendo assim, a turbidez natural da água pode variar de 3 a 500 unidades nefelométricas de turbidez (UNT), entretanto valores elevados acarretam dificuldade de desinfecção provocada pela capacidade de retenção de microrganismos patogênicos por meio dos sólidos presentes na água (BRASIL, 2006).

A determinação de sólidos totais dissolvidos compõe o elenco de determinações exigidas pela Portaria MS 2914/11 como padrão de potabilidade, cujo valor máximo permitido é de 1000 mg L^{-1} . Por essas razões, a determinação de sólidos totais e sua fração volátil foram consideradas no presente estudo e os resultados apresentados nas Figuras 28 c e d, respectivamente, onde se observa que a fonte 11, durante a estação chuvosa, foi a que apresentou a maior concentração de sólidos totais voláteis ($127,8 \text{ mg L}^{-1}$) e fonte 9 durante a estação seca com o menor valor ($3,3 \text{ mg L}^{-1}$). Os sólidos estão presentes na água tanto em decorrência de origem natural (erosão, detritos orgânicos e próprios organismos) como em decorrência da ação humana através do lançamento de esgotos e lixos (BRASIL, 2006). Sólidos na água são caracterizados pela presença de material residual após a elevação da temperatura em um determinado tempo pré-estabelecido. Há diversas frações de sólidos na água (sólidos totais dissolvidos – voláteis ou fixos, em suspensão – sedimentáveis ou não sedimentáveis) cuja diferenciação ocorre durante o procedimento de secagem, filtração e calcinação (CETESB, 2013). A fração volátil está relacionada com a presença de compostos orgânicos na água e, por esta razão, a determinação deste atributo fornece dados complementares na análise da densidade total de bactérias heterotróficas em amostras hídricas, uma vez que tais bactérias fazem uso de matéria orgânica como fonte de energia. Além disso, são diversos os danos causados nos recursos hídricos diante da presença de sólidos em geral, dentre eles destaca-se a decomposição anaeróbia devido à capacidade de reter bactérias e compostos orgânicos no fundo dos rios (CETESB, 2013).

Para facilitar o entendimento, os principais resultados das características microbiológicas, físicas e químicas obtidas das amostras de água, nas diferentes fontes e estações, foram reunidos, de forma compilada, na tabela 5.

Tabela 5 - Relação entre a predominância de fontes com valores mais elevados para as características microbiológicas, físicas e químicas em amostragens hídricas entre as estações chuvosa e seca.

CARACTERÍSTICAS	Fontes Estação chuvosa	Fontes Estação seca
MICROBIOLÓGICAS		
Densidade de heterotróficas	2, 4, 9	1, 3, 5, 6, 10, 11
Coliformes totais	4, 6, 9, 11	1, 2, 3, 5
<i>Escherichia coli</i>	6, 9, 10	1, 2, 3, 5, 11
% Resistência	1, 2, 5, 10, 11	3, 4, 6, 9
FÍSICAS		
Condutividade	1, 3, 4, 6	2, 5, 9, 10, 11
Sólidos Totais	1, 3, 4, 6, 9, 10, 11	2, 5
Sólidos Totais Voláteis	2, 6, 9, 10, 11	1, 3, 4, 5
Turbidez	1, 2, 3, 9, 10, 11	6
QUÍMICAS		
Acidez	11	1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 10
Alcalinidade	1, 3, 4, 6, 10	2, 5, 9, 11
Carbono Orgânico Total	-	1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 11
Dureza	6	1, 2, 3, 4, 5, 9, 10, 11
Oxigênio dissolvido	9, 10, 11	1, 2, 3, 4, 5, 6
pH	2, 3, 4	5, 6, 9, 10, 11

Notas: Não foi possível comparar os resultados das fontes 7 e 8 entre as estações, devido à ausência de amostragem durante a estação seca.

Em cinza escuro, as características cujos números de fontes com valores mais elevados predominou durante a estação chuvosa; em cinza claro, as características cujos números de fontes com valores mais elevados predominou durante a estação seca; em verde, o atributo que apresentou equivalência no número de fontes com valores mais elevados e em branco a classificação do atributo.

Valores mais elevados para as características microbiológicas refletem pior qualidade microbiológica, entretanto, valores elevados para as características físicas e químicas nos recursos hídricos devem ser analisados de acordo com as particularidades individuais de cada atributo.

As amostragens hídricas obtidas das fontes durante a estação chuvosa apresentaram menor relação com as características microbiológicas (*Escherichia coli* e bactérias heterotróficas), porém maior relação com as características físicas (sólidos totais, turbidez e em menor grau com sólidos totais voláteis), químicas (alcalinidade) e maior número de fontes com porcentagens elevadas de resistência de bactérias heterotróficas. Em contrapartida, a estação seca apresentou maior número de fontes contendo valores mais elevados para as características microbiológicas (*Escherichia coli*

e bactérias heterotróficas), físicas (condutividade) e químicas (acidez, carbono orgânico, dureza e em menor grau, oxigênio dissolvido e pH).

5.3 Análise estatística por meio de componentes principais

O método estatístico de componentes principais (PCA – *Principal Component Analysis*) possibilitou fazer a análise simultânea entre todas as características, por meio de uma combinação linear dos dados obtidos.

Para explicar 64% da variância total dos resultados obtidos entre todas as características analisadas durante a estação chuvosa, utilizaram-se três componentes principais, o primeiro (CP1) explicou 27,4%, o segundo (CP2) 19,7% e o terceiro (CP3) explicou 17,2%. Durante a estação seca, a variância de 65% pôde ser explicada pelo primeiro (35,2%), segundo (16,2%) e terceiro (13,8%) componentes principais.

As Tabelas 6 e 7 apresentam os escores obtidos para as características físicas, químicas e microbiológicas durante as estações chuvosa e seca, e os respectivos componentes principais. Entretanto, para facilitar a análise, sublinharam-se os escores com valores maior ou igual a 0,2000 como determinação do componente principal que melhor relaciona-se a cada característica.

Para a estação chuvosa (Tabela 6), o componente principal 3 apresentou melhor relação com as características: física (sólidos totais voláteis), químicas (carbono orgânico total e pH) e microbiológicas (*Escherichia coli*, porcentagem de sensibilidade intermediária e porcentagem de resistência de bactérias heterotróficas aos antimicrobianos cloranfenicol e penicilina). As demais características apresentaram forte relação com os componentes principais 1 e/ou 2, exceto a densidade de bactérias heterotróficas e a porcentagem de resistência à gentamicina, que apresentaram escores abaixo de 0,2000 em todos os componentes. Entretanto, estão melhor relacionados aos componentes principais 1 e 3, respectivamente. Cabe ressaltar que o componente principal 1 apresentou relação significativa com os antimicrobianos testados (70%) para a determinação do perfil de resistência de bactérias heterotróficas.

Tabela 6 – Escores obtidos nos três componentes principais referentes as características físicas, químicas e microbiológicas determinadas em amostragens hídricas obtidas das onze fontes durante a estação chuvosa.

CARACTERÍSTICAS FÍSICAS	Escores		
	CP1	CP2	CP3
Condutividade (COND)	-0,1536	<u>-0,3487</u>	-0,1476
Sólidos Totais (SOL T)	-0,0942	<u>-0,3271</u>	<u>-0,2561</u>
Sólidos Totais Voláteis (SOL T V)	-0,0325	-0,0769	<u>-0,3428</u>
Turbidez (TURB)	<u>0,2213</u>	<u>0,2232</u>	<u>-0,2019</u>
CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS	CP1	CP2	CP3
Acidez (ACID)	<u>-0,2085</u>	-0,0987	0,1371
Alcalinidade (ALCAL)	-0,0694	<u>-0,3099</u>	0,0729
Carbono Orgânico Total (TOC)	0,0581	0,0926	<u>-0,2200</u>
Dureza (DUR)	-0,0955	<u>-0,3426</u>	-0,1350
Oxigênio dissolvido (OD)	<u>0,2113</u>	0,0998	<u>-0,2846</u>
pH	0,1563	-0,0890	<u>-0,2476</u>
CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS	CP1	CP2	CP3
Densidade de heterotróficas (DENST)	0,1307	-0,1232	0,0191
Coliformes totais (COLT)	<u>0,2766</u>	0,1672	-0,1790
<i>Escherichia coli</i> (E.coli)	0,0367	0,1624	<u>-0,3696</u>
% Amoxicilina (AMO %)	<u>-0,3329</u>	-0,0806	-0,0786
% Aztreonam (ATM %)	<u>-0,2694</u>	<u>0,2863</u>	-0,0187
% Cefalexina (CFE %)	-0,1947	0,1387	0,0030
% Cefepime (CPM %)	<u>-0,3179</u>	0,1864	-0,0536
% Cefoxitina (CFO %)	<u>-0,2839</u>	0,1904	0,0730
% Ciprofloxacina (CIP %)	-0,1184	<u>-0,2332</u>	0,0239
% Cloranfenicol (CLO %)	-0,0581	-0,1619	<u>-0,2811</u>
% Gentamicina (GEN %)	0,0684	-0,1153	0,1473
% Penicilina (PEN %)	-0,1886	0,1050	<u>-0,3648</u>
% Vancomicina (VAN %)	0,0048	<u>-0,2955</u>	-0,0813
% Total de Resistência (R%)	<u>-0,3437</u>	0,1142	-0,0948
% Total de Sensibilidade (S%)	<u>0,3238</u>	-0,1088	0,1607
% Total Intermediária (I%)	0,0957	-0,0270	<u>-0,2486</u>

Em relação à estação seca (Tabela 7), o componente principal 3 apresentou melhor relação com as características físicas carbono orgânico total e pH, além das microbiológicas (densidade total de bactérias heterotróficas, bactérias do grupo coliformes totais, *Escherichia coli*, porcentagem de resistência à penicilina e vancomicina, e porcentagem de sensibilidade intermediária de bactérias heterotróficas). Embora as características dureza e sólidos totais voláteis apresentassem escores abaixo da 0,2000 nos três componentes principais, ambas apresentaram melhor relação também com o componente principal 1.

Tabela 7 – Escores obtidos nos três componentes principais referentes as características físicas, químicas e microbiológicas determinadas em amostragens hídricas obtidas das nove fontes durante a estação seca.

CARACTERÍSTICAS FÍSICAS	Escores		
	CP1	CP2	CP3
Condutividade (COND)	-0,0937	<u>0,3399</u>	0,1822
Sólidos Totais (SOL T)	-0,1775	<u>0,3588</u>	0,0809
Sólidos Totais Voláteis (SOL T V)	-0,1889	0,1320	0,1125
Turbidez (TURB)	0,0308	<u>0,2680</u>	<u>0,3542</u>
CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS	CP1	CP2	CP3
Acidez (ACID)	0,0207	<u>0,2020</u>	0,1768
Alcalinidade (ALCAL)	-0,0650	<u>0,2509</u>	-0,0886
Carbono Orgânico Total (TOC)	0,0935	0,1918	<u>-0,2980</u>
Dureza (DUR)	-0,1419	0,1056	0,0707
Oxigênio dissolvido (OD)	-0,1365	<u>0,2426</u>	0,1415
pH	-0,0245	-0,3916	<u>0,2178</u>
CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS	CP1	CP2	CP3
Densidade de heterotróficas (DENS T)	-0,1762	-0,0006	<u>0,4222</u>
Coliformes totais (COLT)	<u>-0,2144</u>	-0,0375	<u>0,2531</u>
<i>Escherichia coli</i> (E.coli)	-0,1528	<u>0,2040</u>	<u>0,2338</u>
% Amoxicilina (AMO %)	<u>0,2415</u>	0,1304	0,1144
% Aztreonam (ATM %)	<u>0,2743</u>	0,1677	-0,0645
% Cefalexina (CFE %)	<u>0,2996</u>	-0,0752	0,0419
% Cefepime (CIP %)	<u>0,3005</u>	-0,0497	0,0344
% Cefoxitina (CFO %)	<u>0,2489</u>	-0,1955	0,0397
% Ciprofloxacina (CIP %)	<u>0,2486</u>	0,0541	<u>0,2001</u>
% Cloranfenicol (CLO %)	<u>0,2612</u>	0,1210	-0,0684
% Gentamicina (GEN %)	0,1766	<u>0,2277</u>	-0,0837
% Penicilina (PEN %)	0,1109	-0,0093	<u>0,2426</u>
% Vancomicina (VAN %)	0,1148	0,1560	<u>0,2932</u>
% Total de Resistência (R%)	<u>0,3187</u>	0,0895	0,0877
% Total de Sensibilidade (S%)	<u>-0,3074</u>	-0,1242	-0,1360
% Total Intermediária (I%)	0,1076	<u>0,2254</u>	<u>0,2834</u>

Baseando-se nestes escores, geraram-se os gráficos dos componentes principais (CP1 x CP2) e (CP1 x CP3) tanto para a estação chuvosa como para a estação seca (Figuras 29 e 30), respectivamente.

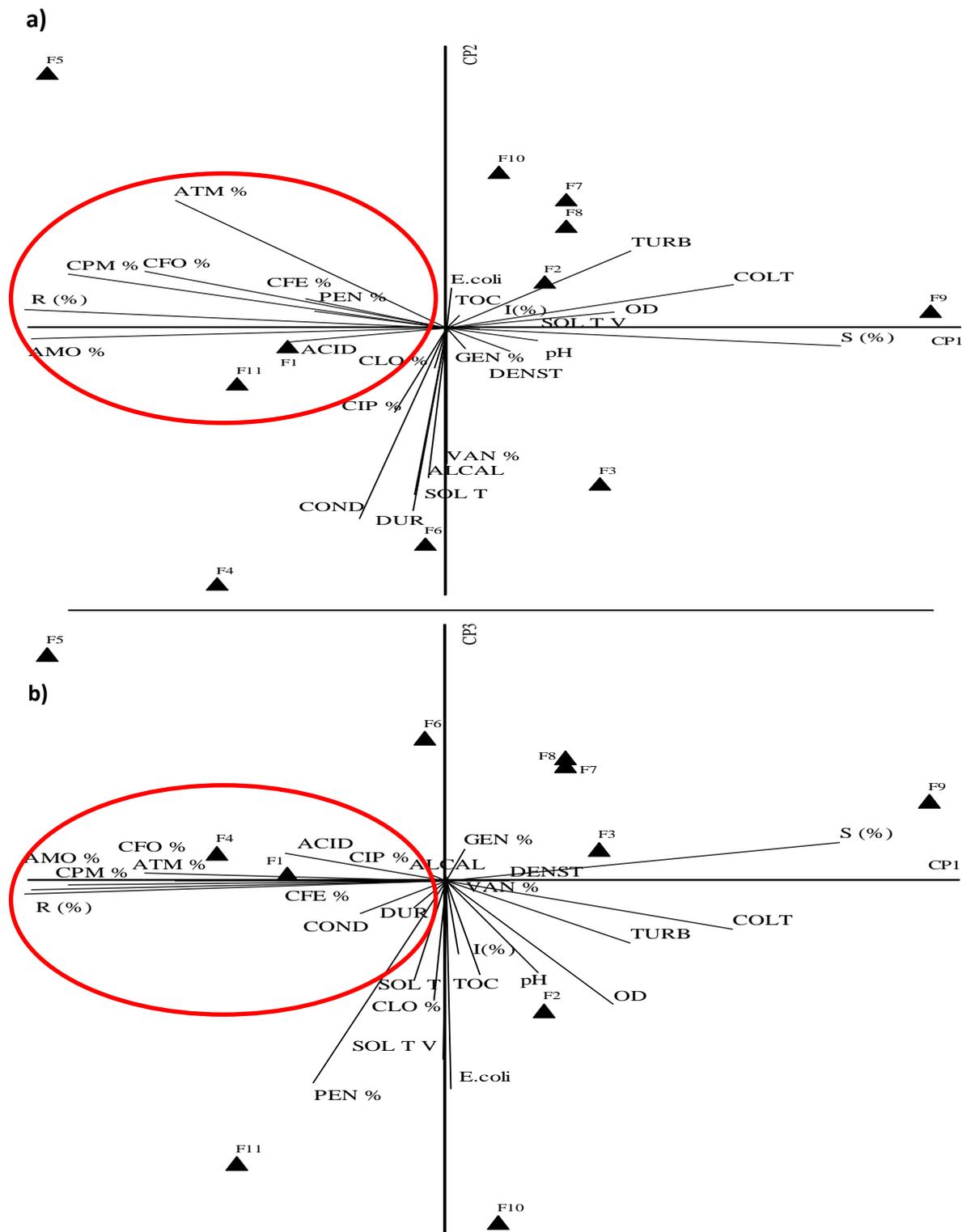


Figura 29 - Componentes principais CP1 x CP2 (a) e CP1 x CP3 (b), oriundos das médias das características físicas, químicas e microbiológicas e do percentual de resistência de bactérias heterotróficas a dez antimicrobianos das amostragens hídricas obtidas de onze fontes (▲), coletadas durante a estação chuvosa.

Em círculo vermelho destacam-se as variáveis relacionadas à resistência aos diferentes antibióticos.

Na estação chuvosa, constata-se (Figura 29) que as águas das fontes 1, 4 e 5 apresentaram relação significativa de resistência bacteriana a um grande número de antibióticos, sendo a água proveniente da fonte 5, assim como constatado anteriormente, a que melhor relacionou-se com elevada porcentagem média de resistência bacteriana e baixa densidade total de bactérias heterotróficas. Tal resultado, contraria aquele recentemente encontrado por Carvalho (2015), que ao analisar a correlação entre resistência de bactérias heterotróficas a antibióticos e as características microbiológicas, em nascentes do município de Itajubá (MG), observou relação positiva entre resistência bacteriana e altas densidades de bactérias heterotróficas, tanto na estação chuvosa como na estação seca. Nota-se também que estas mesmas fontes (1, 4 e 5) apresentaram baixa relação com oxigênio dissolvido, confirmando análises anteriores, o que indica poder haver algum tipo de poluição hídrica.

Ao contrário, as fontes 2, 7, 8, 9 e 10 apresentaram baixa porcentagem de resistência bacteriana aos antimicrobianos e relação significativa com o oxigênio dissolvido, coliformes totais e turbidez. Além disso, as fontes 2 e 10 também apresentaram contagens elevadas de *Escherichia coli*, associadas, principalmente, com valores elevados de pH e carbono orgânico total, este último indicativo de poluição, sugerindo poluição com contaminante fecal.

Baseando-se apenas nos critérios atuais de qualidade microbiológica da água (Portaria 2914/11), a fonte 5, em seu estado bruto, poderia ser considerada a de melhor qualidade durante a estação chuvosa. Entretanto, ao incluir o atributo referente ao perfil de resistência de bactérias heterotróficas, esta fonte teria sua classificação alterada devido ao risco potencial que este recurso hídrico possui de disseminação de resistência bacteriana.

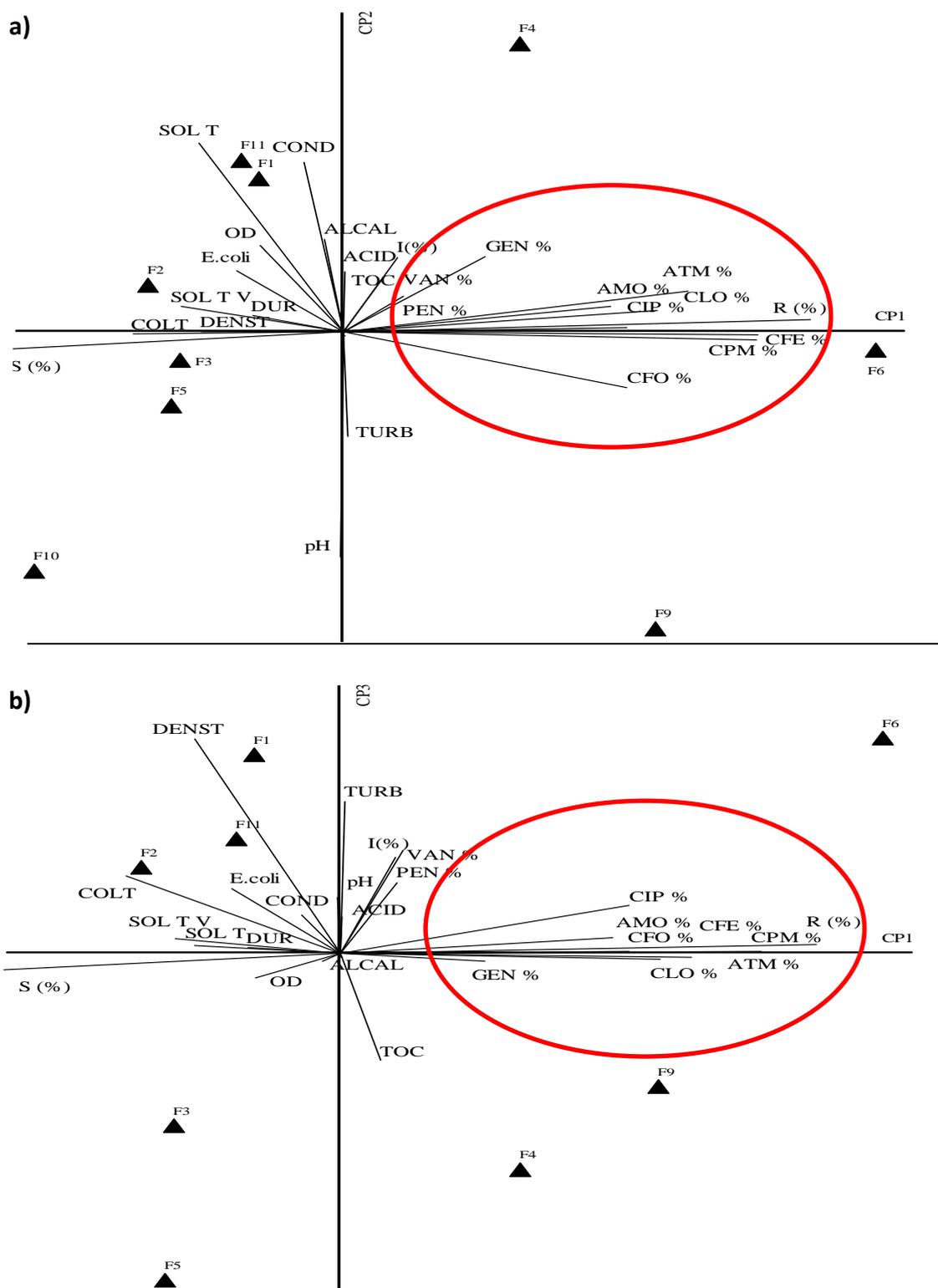


Figura 30 - Componentes principais CP1 x CP2 (a) e CP1 x CP3 (b), oriundos das médias das características físicas, químicas e microbiológicas e do percentual de resistência de bactérias heterotróficas a dez antimicrobianos das amostragens hídricas obtidas de nove fontes (▲), coletadas durante a estação seca.

Em círculo vermelho destacam-se as variáveis relacionadas à resistência aos diferentes antibióticos.

Analisando-se o resultado dos componentes principais durante a estação seca (Figura 30), constatou-se que a fonte 4 manteve relação significativa de resistência bacteriana em isolados de bactérias heterotróficas, acrescentando-se também as fontes 6 e 9. Este resultado corrobora com o que já havia sido apresentado. Estas fontes também não apresentaram relação com densidades elevadas de bactérias heterotróficas o que contraria o resultado apresentado por Carvalho (2015), que encontrou elevada resistência de bactérias heterotróficas a antibióticos, associado a altas densidades de bactérias heterotróficas em seu estudo supracitado.

Ao contrário, as fontes 3, 5 e 10 apresentaram baixa relação com porcentagens de isolados de bactérias heterotróficas resistentes a antibióticos durante a estação seca. Dentre estas fontes, a fonte 5 constitui uma exceção, com resultado inverso para este atributo durante a estação chuvosa, enquanto que as fontes 3 e 10 continuaram apresentando baixo número de isolados resistentes, tanto na estação chuvosa como na seca.

Para finalizar, observou-se que as fontes 1, 2 e 11 apresentaram relação significativa com maiores contagens de *Escherichia coli* e coliformes totais e maiores valores de oxigênio dissolvido, sólidos totais, condutividade e dureza. Valor mais elevado de oxigênio dissolvido (observado nas fontes 3 e 5) foi considerado inversamente proporcional à resistência bacteriana.

Em ambas as estações, valores de oxigênio dissolvido apresentaram correlação negativa com resistência bacteriana (figuras 29 e 30).

O quadro 12 permite a comparação resumida entre a contaminação hídrica com *Escherichia coli*, densidades elevadas de bactérias heterotróficas (acima de 500 UFC mL⁻¹) e maiores porcentagens de resistência bacteriana aos antimicrobianos das fontes potenciais para consumo durante as estações chuvosa e seca, levando em consideração todo o trabalho apresentado.

Quadro 12 – Relação entre fontes com maiores porcentagens de resistência bacteriana, contaminação com *Escherichia coli* e densidade elevada de bactérias heterotróficas (> 500 UFC mL⁻¹), durante as estações chuvosa e seca.

Fonte	Estação chuvosa			Estação seca		
	Maior porcentagem de resistência aos antimicrobianos	Contaminação <i>Escherichia coli</i>	Bactérias heterotróficas (> 500 UFC mL ⁻¹)	Maior porcentagem de resistência aos antimicrobianos	Contaminação <i>Escherichia coli</i>	Bactérias heterotróficas (> 500 UFC mL ⁻¹)
1	X	X			X	X
2		X	X		X	X
3		X			X	
4	X		X	X		
5	X				X	
6		X		X		
7		X	X	*	*	*
8		X	X	*	*	*
9		X	X	X	X	
10		X			X	X
11		X			X	

*Fonte não analisada durante a estação seca devido à ausência de vazão.

É possível observar (Quadro 12) ausência de um padrão que relacione as fontes com maior porcentagem de resistência bacteriana e qualidade microbiológica do recurso hídrico (*Escherichia coli* e densidade elevada de bactérias heterotróficas). Também não se evidenciou relação entre as estações (chuvosa e seca) e o perfil de resistência numa mesma fonte. Resultado semelhante foi apresentado por Carvalho (2015), que também concluiu não haver forte influência destas estações no percentual de resistência bacteriana em amostras obtidas de nascentes no município de Itajubá (MG).

6 CONCLUSÕES

- ✓ As estações do ano afetam a qualidade física, química e microbiológica da água nas diferentes fontes analisadas;
- ✓ Maiores valores de sólidos totais, turbidez e maior tendência média de densidades de bactérias heterotróficas são observadas na época chuvosa;
- ✓ Maior acidez, carbono orgânico total, dureza e crescimento de *Escherichia coli* ocorrem na época seca;
- ✓ Ausência de fontes que atendam, simultaneamente, os critérios de potabilidade exigidos pela portaria vigente;
- ✓ Em ambas as estações, registra-se baixa variabilidade morfocultural em isolados de bactérias heterotróficas obtidos de fontes hídricas;
- ✓ Maior porcentagem média de resistência de bactérias heterotróficas é observada para penicilina, em ambas as estações, seguida pela amoxicilina (estação seca) e aztreonam (estação chuvosa), e menor porcentagem ao ciprofloxacino, em ambas as estações;
- ✓ Não há influência das estações no perfil de resistência de bactérias heterotróficas aos antimicrobianos. No entanto, maior tendência de resistência bacteriana é observada durante a estação seca;
- ✓ Há correlação inversa entre perfil de resistência bacteriana aos antimicrobianos e o oxigênio dissolvido nas duas estações;
- ✓ Maiores porcentagens de resistência de bactérias heterotróficas aos antimicrobianos ocorrem independentemente de densidades elevadas e da contaminação microbiológica da fonte de água estudada.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Há necessidade de novas pesquisas a fim de possibilitar a associação da resistência bacteriana a outras características físicas, químicas e microbiológicas.

A falta de relação entre alta resistência de bactérias heterotróficas aos antimicrobianos e densidades elevadas destas e da contaminação microbiológica do recurso hídrico poderia levar à falsa ideia de ausência de risco neste recurso. Esse resultado é extremamente importante e deve ser considerado em estudos de avaliação de risco quanto ao consumo de águas de nascentes, com boa qualidade em função da avaliação de bactérias heterotróficas.

Observa-se a necessidade de alertar as autoridades sobre a importância do monitoramento ambiental periódico da resistência bacteriana em fontes hídricas potenciais de consumo, independentemente de quaisquer sinais de deterioração da qualidade microbiológica, a fim de antecipar e permitir ações impeditivas frente à possibilidade de migração da resistência bacteriana do reservatório ambiental para o ambiente clínico e hospitalar.

Novos estudos são necessários para a investigação epidemiológica com o propósito de averiguar a ocorrência de infecções bacterianas possíveis de serem transmitidas pela água, principalmente em populações imunologicamente susceptíveis.

REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. Antimicrobianos. 2007a. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosade/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/conceitos.htm>. Acesso em: 15 mar. 2015.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. Resistência microbiana. 2007b. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosade/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo3/mecanismos.htm>. Acesso em: 20 mar. 2015.
- ALANIS, A. J. Resistance to antibiotic: Are we in the post-antibiotic era? **Archives of Medical Research**, v. 36, p. 697-705, 2005.
- ALLEN, M. J.; EDBERG, S. C.; REASONER, D. J. Heterotrophic plate count bacteria – what is their significance in drinking water? **International Journal of Food Microbiology**, v. 92, p. 265-274, 2004.
- ALVARENGA, L. S.V.; NICOLETTI, M. A. Descarte doméstico de medicamentos e algumas considerações sobre o impacto ambiental decorrente. **Revista Saúde**, Guarulhos, v.4, n.3, p. 34-39, 2010.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION - APHA,. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**, 20th. ed. Local: APHA, AWWA, WEF, 1999. 1120p.
- BAISH, A. L. M.; SOARES, M. C. F.; LUNKES, R.; GOULART, I. C.; SILVA, M. G. C. Avaliação do nível de adesão ao tratamento com antimicrobianos. **Vittale**, Rio Grande, v.21, n.2, p. 37-51, 2009.
- BAPTISTA, M. G. F. M. **Mecanismos de resistência aos antibióticos**. 2013. 51f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências e Tecnologias da Saúde, Lisboa, 2013.
- BARTRAM J.; COTRUVO, J.; EXNER, M.; FRICKER, C.; GLASMACHER, A. **Heterotrophic plate counts and drinking water safety:the significance of HPCs for water quality and human health**. Londres: WHO:IWA, 2003.
- BAUER, A. W.; KIRBY, W. M.; SHERRIES, J.C.; TURK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, p.493-496, 1966.
- BENNETT, P.M. Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. **British Journal of Pharmacology**, v.153, p.s347-s357, 2008.
- BIER, O. **Microbiologia e Imunologia**. 3. ed. São Paulo: Melhoramentos, 1994.
- BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Fármacos no meio ambiente. **Química Nova**, Rio de Janeiro, v. 26, n. 4, p. 523-530, 2003.

BOLETIM METEOROLÓGICO CIÊNCIAS ATMOSFÉRICAS-UNIFEI. Itajubá. Disponível em: <http://cat-unifei.blogspot.com.br/2014_01_01_archive.html>. Acesso em: 15 out. 2014.

BRASIL. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 274, de 22 de setembro de 2005. Aprova o regulamento técnico para águas envasadas e gelo. DOU, 23 de Setembro de 2005. Poder executivo, 2005a.

BRASIL. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 275, de 22 de setembro de 2005. Aprova o regulamento técnico de características microbiológicas para água mineral natural e água natural. DOU, 23 de Setembro de 2005. Poder executivo, 2005b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. DOU. nº 239, de 14 de dezembro de 2011, Seção 1, p. 39. Ministério da Saúde. 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Inspeção Sanitária em Abastecimento de água. Brasília: Ministério da Saúde, p. 84, 2007. (Série A. Normas e Manuais Técnicos).

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Vigilância e controle da qualidade da água para consumo humano. Brasília: Ministério da Saúde, p. 212, 2006. (Série B. Textos Básicos de Saúde).

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. CONAMA-Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Ministério do Meio Ambiente, 2005.

BRASIL. Ministério do Planejamento Orçamento e Gestão. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE -@cidades - Itajubá. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/>>. Acesso em: 6 jun. 2015.

CALHEIROS, R. O.; TABAÍ, F. C. V.; BOSQUILIA, S. V.; CALAMARI, M. **Preservação e recuperação das nascentes**. 1. ed. Piracicaba: Comitê das Bacias Hidrográficas dos Rios PCJ - CTRN, 2004.

CARVALHO, B. M. F. **Qualidade hídrica e perfil de resistência de bactérias heterotróficas em águas de nascentes sobre diferentes usos do solo, na microbacia do ribeirão José Pereira (Itajubá – MG)**. 2015. 93f. Dissertação (Mestrado em Meio Ambiente e Recursos Hídricos) - Universidade Federal de Itajubá, Itajubá (MG), 2015.

CARVALHO, V. D. N.; COGO, L. L. Resistência as polimixinas em bactérias Gram-negativas: uma revisão microbiológica. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v. 15, n.1, Jan.-Mar., 2014.

CAUMO, K.; DUARTE, M.; CARGNIN, S. T.; RIBEIRO, V. B. Resistência bacteriana no meio ambiente e implicações na clínica hospitalar. **Revista Liberato**, Novo Hamburgo, v. 11, n.16, p.89-188, 2010.

COMPANHIA DE SANEAMENTO BÁSICO DO ESTADO DE SÃO PAULO - SABESP. Nova Portaria de Potabilidade de água: busca de consenso para viabilizar a melhoria da qualidade de água potável distribuída no Brasil. **DAE**, n. 189, p.6-14, São Paulo (SP), 2012.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL - CETESB. Norma técnica L5 201, de janeiro de 2006. Contagem de bactérias heterotróficas: método de ensaio. São Paulo, p. 14, 2006.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL - CETESB. Relatório de qualidade das águas superficiais no Estado de São Paulo. Apêndice D: Significado ambiental e sanitário das variáveis de qualidade. São Paulo, p. 48, 2013.

CORREA, S.M.B.B. **Probabilidade e estatística**. 2ªed. Campinas: Pontifícia Universidade Católica de Minas, 2003.

DONADIO, N. M. M.; GALBIATTI, J. A.; PAULA, R. C. Qualidade da água de nascentes com diferentes usos do solo na bacia hidrográfica do córrego Rico, São Paulo, Brasil. **Engenharia agrícola**, Jaboticabal, v. 25, n. 1, p. 115-125, 2005.

DOMINGUES, V. O.; TAVARES, G. D.; STÜKEN, F.; MICHELOT, T. M.; REETZ, L. G. B.; BERTONCHELI, C. M.; HÖMER, R. Contagem de bactérias heterotróficas na água para consumo humano: comparação entre duas metodologias. **Saúde**, Santa Maria, v. 33, n.1, p.15-19, 2007.

DUARTE, P. B. **Microrganismos indicadores de poluição fecal em recursos hídricos**. 2011. 51p. Monografia (Pós graduação em Microbiologia) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte (MG), 2011.

FIOL, D. F. S.; MATTOS FILHO, T. R.; GROppo, F. C. Resistência bacteriana. **Revista Brasileira de Medicina**., Rio de Janeiro (RJ), v.57, n.10, p. 1129-1140, 2000.

GANGLE, B. J. **Sources and occurrence of antibiotic resistance in the environment**. College Park: University of Maryland, 2005. 125p. Tese (Mestrado) - Faculty of the Graduate School of the University of Maryland, College Park, 2005.

GASPAROTTO, F. A. **Avaliação ecotoxicológica e microbiológica da água de nascentes urbanas no município de Piracicaba - SP**. 2011. 90f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

IDEXX Laboratories. Tabela Quanti-Tray®. Westbrook, Maine, EUA. 2000.

ITAJUBÁ. Prefeitura Municipal de Itajubá, 2014. Disponível em: <<http://www.itajuba.mg.gov.br/cidade/localizacao.php>>. Acesso em: 20 maio 2014.

JORGENSEN, J. H.; FERRARO, M. J. Antimicrobial susceptibility testing: general principles and contemporary practices. **Clinical Infectious Diseases**, Texas, v. 6, p. 973-80, 1998.

KORB, A.; GELLER, B. M. R. O conhecimento como fator determinante para o enfrentamento dos problemas ambientais e de saúde. In: CONGRESSO NACIONAL DE EDUCAÇÃO – EDUCERE, 9., 2009, Local. **Anais...** Local: Pontifícia Universidade Católica (PUC), 2009.

LIMA, J. A.; DAMBROS, M. V. R.; ANTONIO, M. A. P. M.; JANZEN, J. G.; MARCHETO, M. Potencial da economia de água potável pelo uso de água pluvial: análise de 40 cidades da Amazônia. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 16, p. 291-298, 2011.

LOPES, A. A.; SALGADO, K.; MARTINELLI, R.; ROCHA, H. Aumento da frequência de resistência à norfloxacin e ciprofloxacina em bactérias isoladas em uroculturas. **Associação Médica Brasileira**, v. 44, n.3, p. 196-200,1998.

MACEDO, A. S. G. T. **Caracterização de *Enterococcus* spp. resistentes isolados de águas não tratadas destinadas ao consumo humano**. 2011. 63f. Dissertação (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Fernando Pessoa, Porto (Portugal), 2011.

MARTINS, A. T.; KAWAKUBO, F. S. A influência do uso e ocupação do solo nas características de potabilidade da água de nascentes: exemplo de caso no município de Alfenas - MG. In: JORNADA CIENTÍFICA DE GEOGRAFIA, UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS, 3., 2012, Alfenas. **Anais Alfenas: UNIFAL**, 2012.

McCUNE, B.; MEFFORD, M.J. **Multivariate analysis of ecological data**. Version 3.12. Gleneden Beach: MjM Software, 1997.

MELLADO, P. H. G. **Qualidade e consumo das águas de nascentes (bicas) de Piracicaba - SP**. 2008. 48f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Metodista de Piracicaba - UNIMEP, Piracicaba, 2008.

MELO, S. A. A. S.; TROVÓ, A. G.; BAUTITZ, I. R.; NOGUEIRA, R. F. P. Degradação de fármacos residuais por processos oxidativos avançados. **Química Nova**, Araraquara (SP), v.32, n.1, p. 188-197, 2009.

MESSIAS, T. G. **Influência da toxicidade da água e do sedimento dos rios São Joaquim e Ribeirão Claro na bacia do Corumbataí**. 2008. 126f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade de São Paulo, Piracicaba (SP), 2008.

MOTA, R. A., SILVA, K. P. C; PORTO, W. J. N; SILVA, L. B. G. Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multirresistência bacteriana. **Brazilian Journal of Veterinaria Research Animal Science**, São Paulo, v. 42, n. 6, p. 465-470, 2005.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A.; tradução: TABORDA, C. P. et al. **Microbiologia médica**. 6 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.

NCCLS. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard** - 8.ed., v.23, n.1, NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

PROGRAMA DAS NAÇÕES UNIDAS PARA O DESENVOLVIMENTO - PNUD. Relatório do desenvolvimento humano 2006. Publicado para o Programa das Nações Unidas para o desenvolvimento (PNUD). Disponível em: <www.pnud.orb.br> Acesso em: 07 jul. 2015.

PONGELUPPE, A. T.; OLIVEIRA, B. D.; SILVA, E. A; AGUILEIRA, K. K.; ZITEL, V.; BASTOS, M. F. Avaliação de coliformes totais, fecais em bebedouros localizados em uma instituição de ensino de Guarulhos. **Revista Saúde**, v. 3, n. 2, 2009.

PRZYGODDA, F.; BONA, E. A. M. D.; FALCONI, F. A. Quantificação de coliformes totais e *Escherichia coli* da água in natura dos municípios pertencentes a 10ª regional da saúde. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE CIÊNCIA, TECNOLOGIA E AMBIENTE DO ESTADO DO PARANÁ, 1., 2009, Cascavel. **Anais Cascavel (PR): editora**, 2009..

QUIROZ, C. C. Água embotellada y su calidad bacteriológica. *Água Latinoamérica*. Set/out. 2002. Disponível em: <<http://www.agualatinoamerica.com/docs/PDF/9-10-02aguaemb.pdf>>. Acesso em: 09 jun. 2015.

ROCHA, V. S. **Determinação de carbono orgânico assimilável em amostras de água. Estudo de comparação do método de determinação da concentração de ATP com o método clássico de contagem de colônias**. 2007, 96 f. Dissertação (Mestrado em engenharia biológica)- Universidade Técnica de Lisboa, Portugal, 2007.

SPERLING, M. V. **Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos**. 3 ed. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2005.

TAVARES, W. Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. **Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 33, n. 3, 2000.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L; tradução: SILVA, A. M. et al. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. **Antimicrobial Resistance: global report on surveillance**. Jun. 2014. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748_eng.pdf?ua=1>. Acesso em: 22 maio 2015.

ZIN, G. Z.; SIMM, K. C. B. **Análise da susceptibilidade a antibióticos de bactérias presentes nas águas dos mananciais de abastecimento da cidade de Cascavel – PR**. Cascavel, PR. Faculdade de Ciências Biológicas, Faculdade Assis Gurgacz, 2007, Paraná, Brasil.

ANEXO I - Modelo da tabela de conversão das cavidades positivas em número mais provável de coliformes totais e *Escherichia coli* em 100 mL de amostragem hídrica.

# Large Wells Positive	IDEXX Quanti-Tray®/2000 MPN Table (per 100ml)																								
	# Small Wells Positive																								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
0	<1	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0	9.0	10.0	11.0	12.0	13.0	14.1	15.1	16.1	17.1	18.1	19.1	20.2	21.2	22.2	23.3	24.3
1	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	7.1	8.1	9.1	10.1	11.1	12.1	13.2	14.2	15.2	16.2	17.3	18.3	19.3	20.4	21.4	22.4	23.5	24.5	25.6
2	2.0	3.0	4.1	5.1	6.1	7.1	8.1	9.2	10.2	11.2	12.2	13.3	14.3	15.4	16.4	17.4	18.5	19.5	20.6	21.6	22.7	23.7	24.8	25.8	26.9
3	3.1	4.1	5.1	6.1	7.2	8.2	9.2	10.3	11.3	12.4	13.4	14.5	15.5	16.5	17.6	18.6	19.7	20.8	21.8	22.9	23.9	25.0	26.1	27.1	28.2
4	4.1	5.2	6.2	7.2	8.3	9.3	10.4	11.4	12.5	13.5	14.6	15.6	16.7	17.8	18.8	19.9	21.0	22.0	23.1	24.2	25.3	26.3	27.4	28.5	29.6
5	5.2	6.3	7.3	8.4	9.4	10.5	11.5	12.6	13.7	14.7	15.8	16.9	17.9	19.0	20.1	21.2	22.2	23.3	24.4	25.5	26.6	27.7	28.8	29.9	31.0
6	6.3	7.4	8.4	9.5	10.6	11.6	12.7	13.8	14.9	16.0	17.0	18.1	19.2	20.3	21.4	22.5	23.6	24.7	25.8	26.9	28.0	29.1	30.2	31.3	32.4
7	7.5	8.5	9.6	10.7	11.8	12.8	13.9	15.0	16.1	17.2	18.3	19.4	20.5	21.6	22.7	23.8	24.9	26.0	27.1	28.3	29.4	30.5	31.6	32.8	33.9
8	8.6	9.7	10.8	11.9	13.0	14.1	15.2	16.3	17.4	18.5	19.6	20.7	21.8	22.9	24.1	25.2	26.3	27.4	28.6	29.7	30.8	32.0	33.1	34.3	35.4
9	9.8	10.9	12.0	13.1	14.2	15.3	16.4	17.6	18.7	19.8	20.9	22.0	23.2	24.3	25.4	26.6	27.7	28.9	30.0	31.2	32.3	33.5	34.6	35.8	37.0
10	11.0	12.1	13.2	14.4	15.5	16.6	17.7	18.9	20.0	21.1	22.3	23.4	24.6	25.7	26.9	28.0	29.2	30.3	31.5	32.7	33.8	35.0	36.2	37.4	38.6
11	12.2	13.4	14.5	15.6	16.8	17.9	19.1	20.2	21.4	22.5	23.7	24.8	26.0	27.2	28.3	29.5	30.7	31.9	33.0	34.2	35.4	36.6	37.8	39.0	40.2
12	13.5	14.6	15.8	16.9	18.1	19.3	20.4	21.6	22.8	23.9	25.1	26.3	27.5	28.6	29.8	31.0	32.2	33.4	34.6	35.8	37.0	38.2	39.5	40.7	41.9
13	14.8	16.0	17.1	18.3	19.5	20.6	21.8	23.0	24.2	25.4	26.6	27.8	29.0	30.2	31.4	32.6	33.8	35.0	36.2	37.5	38.7	39.9	41.2	42.4	43.6
14	16.1	17.3	18.5	19.7	20.9	22.1	23.3	24.5	25.7	26.9	28.1	29.3	30.5	31.7	33.0	34.2	35.4	36.7	37.9	39.1	40.4	41.6	42.9	44.2	45.4
15	17.5	18.7	19.9	21.1	22.3	23.5	24.7	25.9	27.2	28.4	29.6	30.9	32.1	33.3	34.6	35.8	37.1	38.4	39.6	40.9	42.2	43.4	44.7	46.0	47.3
16	18.9	20.1	21.3	22.6	23.8	25.0	26.2	27.5	28.7	30.0	31.2	32.5	33.7	35.0	36.3	37.5	38.8	40.1	41.4	42.7	44.0	45.3	46.6	47.9	49.2
17	20.3	21.6	22.8	24.1	25.3	26.6	27.8	29.1	30.3	31.6	32.9	34.1	35.4	36.7	38.0	39.3	40.6	41.9	43.2	44.5	45.9	47.2	48.5	49.8	51.2
18	21.8	23.1	24.3	25.6	26.9	28.1	29.4	30.7	32.0	33.3	34.6	35.9	37.2	38.5	39.8	41.1	42.4	43.8	45.1	46.5	47.8	49.2	50.5	51.9	53.2
19	23.3	24.6	25.9	27.2	28.5	29.8	31.1	32.4	33.7	35.0	36.3	37.6	39.0	40.3	41.6	43.0	44.3	45.7	47.1	48.4	49.8	51.2	52.6	54.0	55.4
20	24.9	26.2	27.5	28.8	30.1	31.5	32.8	34.1	35.4	36.8	38.1	39.5	40.8	42.2	43.6	44.9	46.3	47.7	49.1	50.5	51.9	53.3	54.7	56.1	57.6
21	26.5	27.9	29.2	30.5	31.8	33.2	34.5	35.9	37.3	38.6	40.0	41.4	42.8	44.1	45.5	46.9	48.4	49.8	51.2	52.6	54.1	55.5	56.9	58.4	59.9
22	28.2	29.5	30.9	32.3	33.6	35.0	36.4	37.7	39.1	40.5	41.9	43.3	44.8	46.2	47.6	49.0	50.5	51.9	53.4	54.8	56.3	57.8	59.3	60.8	62.3
23	29.9	31.3	32.7	34.1	35.5	36.8	38.3	39.7	41.1	42.5	43.9	45.4	46.8	48.3	49.7	51.2	52.7	54.2	55.6	57.1	58.6	60.2	61.7	63.2	64.7
24	31.7	33.1	34.5	35.9	37.3	38.8	40.2	41.7	43.1	44.6	46.0	47.5	49.0	50.5	52.0	53.5	55.0	56.5	58.0	59.5	61.1	62.6	64.2	65.8	67.3
25	33.6	35.0	36.4	37.9	39.3	40.8	42.2	43.7	45.2	46.7	48.2	49.7	51.2	52.7	54.3	55.8	57.3	58.9	60.5	62.0	63.6	65.2	66.8	68.4	70.0
26	35.5	36.9	38.4	39.9	41.4	42.8	44.3	45.9	47.4	48.9	50.4	52.0	53.5	55.1	56.7	58.2	59.8	61.4	63.0	64.7	66.3	67.9	69.6	71.2	72.9
27	37.4	38.9	40.4	42.0	43.5	45.0	46.5	48.1	49.6	51.2	52.8	54.4	56.0	57.6	59.2	60.8	62.4	64.1	65.7	67.4	69.1	70.8	72.5	74.2	75.9
28	39.5	41.0	42.6	44.1	45.7	47.3	48.8	50.4	52.0	53.6	55.2	56.9	58.5	60.2	61.8	63.5	65.2	66.9	68.6	70.3	72.0	73.7	75.5	77.3	79.0
29	41.7	43.2	44.8	46.4	48.0	49.6	51.2	52.8	54.5	56.1	57.8	59.5	61.2	62.9	64.6	66.3	68.0	69.8	71.5	73.3	75.1	76.9	78.7	80.5	82.4
30	43.9	45.5	47.1	48.7	50.4	52.0	53.7	55.4	57.1	58.8	60.5	62.2	64.0	65.7	67.5	69.3	71.0	72.9	74.7	76.5	78.3	80.2	82.1	84.0	85.9
31	46.2	47.9	49.5	51.2	52.9	54.6	56.3	58.1	59.8	61.6	63.3	65.1	66.9	68.7	70.5	72.4	74.2	76.1	78.0	79.9	81.8	83.7	85.7	87.6	89.6
32	48.7	50.4	52.1	53.8	55.6	57.3	59.1	60.9	62.7	64.5	66.3	68.2	70.0	71.9	73.8	75.7	77.6	79.5	81.5	83.5	85.4	87.5	89.5	91.5	93.6
33	51.2	53.0	54.8	56.5	58.3	60.2	62.0	63.8	65.7	67.6	69.5	71.4	73.3	75.2	77.2	79.2	81.2	83.2	85.2	87.3	89.3	91.4	93.5	95.7	97.8
34	53.9	55.7	57.6	59.4	61.3	63.1	65.0	67.0	68.9	70.8	72.8	74.8	76.8	78.8	80.8	82.9	85.0	87.1	89.2	91.4	93.5	95.7	97.9	100.2	102.4
35	56.8	58.6	60.5	62.4	64.4	66.3	68.3	70.3	72.3	74.3	76.3	78.4	80.5	82.6	84.7	86.9	89.1	91.3	93.5	95.7	98.0	100.3	102.6	105.0	107.3
36	59.8	61.7	63.7	65.7	67.7	69.7	71.7	73.8	75.9	78.0	80.1	82.3	84.5	86.7	88.9	91.2	93.5	95.8	98.1	100.5	102.9	105.3	107.7	110.2	112.7
37	62.9	65.0	67.0	69.1	71.2	73.3	75.4	77.6	79.8	82.0	84.2	86.5	88.8	91.1	93.4	95.8	98.2	100.6	103.1	105.6	108.1	110.7	113.3	115.9	118.6
38	66.3	68.4	70.6	72.7	74.9	77.1	79.4	81.6	83.9	86.2	88.6	91.0	93.4	95.8	98.3	100.8	103.4	105.9	108.6	111.2	113.9	116.6	119.4	122.2	125.0
39	70.0	72.2	74.4	76.7	78.9	81.3	83.6	86.0	88.4	90.9	93.4	95.9	98.4	101.0	103.6	106.3	109.0	111.8	114.6	117.4	120.3	123.2	126.1	129.2	132.2
40	73.8	76.2	78.5	80.9	83.3	85.7	88.2	90.8	93.3	95.9	98.5	101.2	103.9	106.7	109.5	112.4	115.3	118.2	121.2	124.3	127.4	130.5	133.7	137.0	140.3
41	78.0	80.5	83.0	85.5	88.0	90.6	93.3	95.9	98.7	101.4	104.3	107.1	110.0	113.0	116.0	119.1	122.2	125.4	128.7	132.0	135.4	138.8	142.3	145.9	149.5
42	82.6	85.2	87.8	90.5	93.2	96.0	98.8	101.7	104.6	107.6	110.6	113.7	116.9	120.1	123.4	126.7	130.1	133.6	137.2	140.8	144.5	148.3	152.2	156.1	160.2
43	87.6	90.4	93.2	96.0	99.0	101.9	105.0	108.1	111.2	114.5	117.8	121.1	124.6	128.1	131.7	135.4	139.1	143.0	147.0	151.0	155.2	159.4	163.8	168.2	172.8
44	93.1	96.1	99.1	102.2	105.4	108.6	111.9	115.3	118.7	122.3	125.9	129.6	133.4	137.4	141.4	145.5	149.7	154.1	158.5	163.1	167.9	172.7	177.7	182.9	188.2
45	99.3	102.5	105.8	109.2	112.6	116.2	119.8	123.6	127.4	131.4	135.4	139.6	143.9	148.3	152.9	157.6	162.4	167.4	172.6	178.0	183.5	189.2	195.1	201.2	207.5
46	106.3	109.8	113.4	117.2	121.0	125.0	129.1	133.3	137.6	142.1	146.7	151.5	156.5	161.6	167.0	172.5	178.2	184.2	190.4	196.8	203.5	210.5	217.8	225.4	233.3
47	114.3	118.3	122.4	126.6	130.9	135.4	140.1	145.0	150.0	155.3	160.7	166.4	172.3	178.5	185.0	191.8	198.9	206.4	214.2	222.4	231.0	240.0	249.5	259.5	270.0
48	123.9	128.4	133.1	137.9	143.0	148.3	153.9	159.7	165.8	172.2	178.9	186.0	193.5	201.4	209.8	218.7	228.2	238.2	248.9	260.3	272.3	285.1	298.7	313.0	328.2
49	135.5	140.8	146.4	152.3	158.5	165.0	172.0	179.3	187.2	195.6	204.6	214.3	224.7	235.9	248.1	261.3	275.5								